

JULIANA CASARES MANDARINO RIBEIRO

ESTUDO DA SUCESSÃO MICROBIANA EM
AMBIENTES MARINHOS



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
MARÇO/2022**

Trabalho a ser realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Diogo Jurelevicius e coorientação de Isabella Campelo Vilardi Argentino.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

CC335e Casares Mandarinino Ribeiro , Juliana
Estudo da Sucessão microbiana em ambientes
marinhos / Juliana Casares Mandarinino Ribeiro . --
Rio de Janeiro, 2022.
42 f.

Orientador: Diogo Jurelevicius.
Coorientadora: Isabella Campelo.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Sucessão Microbiana. 2. Microbiologia
marinha. 3. Hexadecano. 4. Biologia molecular. I.
Jurelevicius, Diogo , orient. II. Campelo,
Isabella, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

FOLHA DE APROVAÇÃO

JULIANA CASARES MANDARINO RIBEIRO

ESTUDO DA SUCESSÃO MICROBIANA EM AMBIENTES MARINHOS

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES /
UFRJ COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO****ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**ALUNO: **Juliana Casares Mandarinino Ribeiro**

DRE: 118068063

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Lucy Seldin (Presidente)

M.Sc. Douglas Monteiro

Profa. Ana Maria Mazzoto de Almeida

Prof. Mateus Godoy (Suplente)

Título da Monografia: **“Estudo da sucessão microbiana em ambientes
marinhos”**Local: Sala virtual <https://meet.google.com/vut-rtfr-qmd>Data e hora de início: **11 de março de 2022 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 8,5 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 11 de março de 2022.

NOTA Banca Examinadora:

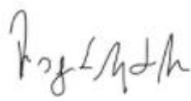
8,5 Profa. Lucy Seldin8,5 M.Sc. Douglas Monteiro-- Profa. Ana Maria Mazzoto de Almeida8,5 Prof. Mateus Godoy

Presidente da Banca: 

Prof. Lucy Seldin

Aluna: 

Juliana Casares Mandarinno Ribeiro

Orientador: 

Prof. Diogo Jurelevicius

Coordenador de TCC: 

Prof. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Diogo Jurelevicius. Além de ser um excelente professor, é um orientador excepcional. Sempre soube nos acalmar visto a pressão acadêmica que submetidos. Serei sempre grata pelos ensinamentos, paciência para minhas milhares de pergunta, pela compreensão nos diversos momentos que a minha cabeça já não funcionava mais e pela companhia no trabalho durante a madrugada, respondendo e-mails enviados até 3 da manhã.

Agradeço também a minha coorientadora Isabella Campelo, que foi essencial para minha jornada dentro da iniciação científica. Assim como o Diogo, a Isa se dispôs para responder perguntas infinitas, sempre com muita paciência e carinho comigo. Sua companhia no laboratório era sempre ótima, fosse falando de friends, rebelde, da vida eco friendly ou cantando as mesmas musicas repetidas que tocavam na rádio. Muito Obrigada Isa, estarei sempre torcendo pelas suas conquistas. Não poderia deixar de agradecer a minha outra fiel companheira de laboratório, a Angela. Angelita sempre bem humorada, disposta a me auxiliar e sempre boa de conversar. Foi muito bom dividir a experiência de graduação com você e volta e meia surtar com as datas de entrega juntas.

Também agradeço a meus amigos de faculdade. Cada um, de uma maneira diferente, foi essencial para que eu chegasse ao final da Graduação. Em especial a minha amiga Victoria que esteve presente em quase todas as avaliações que fiz, fosse estudando comigo sentada nos corredores do CCS, trocando fotos das anotações de todas as aulas, fazendo trabalho em dupla ou grupos e é claro, me apoiando quando eu achava que uma nota ruim era o fim do mundo. Não importa qual rumo meus colegas vão tomar profissionalmente, sei que todos serão excelentes pelo caráter e pela dedicação que têm. Foi um prazer imenso conhecer cada um deles, e espero os levar comigo para os novos ciclos.

Á minha família, chega a me faltar palavras. Começando pelo meu pai, que também é meu maior fã, sempre me apoiou em todas as minhas decisões, e me incentivou a seguir o caminho que meu coração mandasse, mesmo que ele não o entendesse bem. Enquanto eu traçava minha jornada acadêmica, ele começava uma nova jornada profissionalmente já na sua terceira idade. Como tudo que ele se propõe a fazer, está sendo executada com tamanha excelência que só ele é capaz de proporcionar, e mais uma vez está me enchendo de orgulho. Que sorte a minha ser filha do Sergio Arthur e poder compartilhar a vida ao lado dele.

Minha mãe, apelidada de Sandrão, é do 8 a 80. Ou esta pacata, dormindo tranquila, ou está agitando a casa, sem nem parar para respirar direito. É alegria de toda festa, musa fitness e

esconde muito bem a sua idade. É difícil a descrever, já que é tanta coisa em uma pessoa só. Muito amor pela minha Sandrão, que quando descobrir que eu a chamei assim em um documento vai reclamar por pelo menos 3 dias.

Flavia, minha irmã, também não pode faltar. A mais equilibrada da casa, que não atoa seguiu o rumo da psicologia. Desde pequena me ensinou tanto, seja de coisas fúteis como quais roupas combinam ou de coisas essenciais, como política. Sempre acreditou no meu potencial, mas também sempre deixou claro que o posto de nerd da família era meu. Obrigada pela parceria, desde quando eu nasci até agora. Não há irmã melhor que você.

Meu cachorrinho, Oliver Gustavo (Olie para os íntimos), que por mais que não saiba do que agradecimentos se tratem, merece a parte dele também. Durante a pandemia ele chegou e mudou à família pra melhor. Sempre estamos bem se estamos com ele. Além disso, me acompanhou veementemente no EAD. Enquanto via aulas, estudava e fazia provas, ele estava sempre dormindo nos meus pés – muitas vezes roncando para eu não me sentir sozinha. Inclusive, fez participação especial em apresentações de trabalhos, dormindo ao fundo também, é claro. O Olie é a melhor companhia que eu poderia ter durante esse tempo somente interações digitais e o alívio mental que a presença dele me trouxe foi essencial.

Caio, meu namorado, também se fez necessário durante meu caminhar acadêmico. Sempre de braços abertos para me acalmar, escutar meus choros, dar motivação e me regar de elogios pelo básico que eu fazia. Caio é um menino incrível, muito inteligente, competente, carinhoso e, de longe, a pessoa mais proativa que eu conheço. Nunca mediu esforços para me ajudar e me ver bem. Eu só tenho a agradecer a cada momento que dividimos e que assim seja por muito tempo. A minhas amigas Júlia, Julie, Maria Clara, Fatima e Bia, que sorte que eu tenho de compartilhar minha vida com um grupo de mulheres tão maravilhosas como vocês. Nosso grupo começou a se formar quando tínhamos 3 anos e fomos ficando juntas desde então. Cada uma de um jeito, fazendo trajetórias distintas, mas mesmo assim unidas, sempre nos apoiando. Espero comemorar todas as vitórias de vocês, que tenho certeza que serão muitas, assim como estarei sempre esperando vocês para comemorar as minhas. Obrigada por sempre estarem do meu lado.

Agradeço também a Faperj, pelo aporte financeiro durante um ano do projeto.

RESUMO

JULIANA CASARES MANDARINO RIBEIRO

ESTUDO DA SUCESSÃO MICROBIANA EM AMBIENTES MARINHOS

Orientador: Diogo Jurelevicius

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Neste projeto visamos maior entendimento sobre sucessão microbiana em ambientes marinhos. Nossa hipótese é que alterações nas condições ambientais possam causar perda de diversidade microbiana. Dessa maneira, nosso estudo pretende avaliar se: (i) a regeneração de um ambiente impactado causará a regeneração da diversidade microbiana; (ii) um ambiente exógeno pode servir como banco de diversidade microbiana para recolonização de um ambiente impactado; e (iii) a perda de diversidade microbiana é irreparável (extinção). Para atingir esses objetivos, nosso estudo avaliou a comunidade microbiana presente em água marinha (A) e em água marinha previamente contaminada com hexadecano (C). Com essas amostras foram montados biorreatores contendo 400 ml de amostra (A ou C). A cada 2 dias o conteúdo dos biorreatores foi parcialmente trocado representando 4 tratamentos: (i) iniciado com água marinha + água marinha esterilizada, (ii) iniciado com água marinha contaminada + água marinha, (iii) iniciado com água marinha contaminada + água marinha esterilizada, e (iv) iniciado com água marinha contaminada + água marinha esterilizada + comunidade microbiana de solo. Esses biorreatores foram incubados por 16 dias e a análise da comunidade microbiana foi dividida igualmente em dois períodos: período inicial (1) e período final (2). Cada período foi representado por 4 amostras. A comunidade microbiana presente nos biorreatores foi avaliada através de sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S seguida de análise de bioinformática utilizando o programa QIIME2. Foram feitas as análises de alfa diversidade (índice de Shannon e de Faith-PD) e de beta diversidade (baseado nas métricas weighted e unweighted Unifrac). No geral, nossos resultados mostraram que: (i) avaliando a alfa diversidade a contaminação

ambiental não resultou em perda significativa na diversidade das comunidades microbianas; (ii) a suplementação de microrganismos é essencial para manter a diversidade microbiana em amostras de água marinha; (iii) comunidade microbianas exógenas não auxiliaram na regeneração da diversidade microbiana; e (iv) os tratamentos dos diferentes biorreatores alteraram a estrutura, mas não a composição da comunidade microbiana. Por fim, esse trabalho foi um passo em direção a compreensão de como ocorre a sucessão microbiana em ambientes marinhos.

Palavras-Chave: Sucessão Microbiana, Microbiologia Marinho, Hexadecano, Biologia Molecular

ABSTRACT

JULIANA CASARES MANDARINO RIBEIRO

ESTUDO DA SUCESSÃO MICROBIANA EM AMBIENTES MARINHOS

Orientador: Diogo Jurelevicius

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

In this project we aim for a better understanding of microbial succession in marine environments. Our hypothesis is that changes in environmental conditions may cause a loss of microbial diversity. Thus, our study aims to assess whether: (i) the regeneration of an impacted environment will cause the regeneration of microbial diversity; (ii) an exogenous environment can serve as a microbial diversity bank for the recolonization of an impacted environment; and (iii) if the loss of microbial diversity is irreparable (extinction). To achieve these goals, our study evaluated the microbial community present in marine water (A) and in marine water previously contaminated with hexadecane (C). With these samples, bioreactors containing 400 ml of sample (A or C) were set up. Every 2 days the content of the bioreactors was partially changed representing 4 treatments: (i) started with marine water + sterilized marine water, (ii) started with contaminated marine water + marine water, (iii) started with contaminated marine water + sterilized marine water, and (iv) started with contaminated marine water + sterilized marine water + soil microbial community. These bioreactors were incubated for 16 days and the analysis of the microbial community was divided equally into two periods: initial period (1) and final period (2). Each period was represented by 4 samples. The microbial community present in the bioreactors was evaluated by sequencing the gene encoding 16S rRNA followed by bioinformatics analysis using the QIIME2 program. Analysis of alpha diversity (Shannon and Faith-PD index) and beta diversity (based on Unifrac weighted and unweighted metrics) were performed. Overall, our results showed that: (i) assessing alpha diversity, environmental contamination did not result in a significant loss in the diversity of microbial communities; (ii)

the supplementation of microorganisms is essential to maintain microbial diversity in marine water samples; (iii) exogenous microbial communities did not help in the regeneration of microbial diversity; and (iv) the treatments of the different bioreactors altered the structure, but not the composition of the microbial community. Finally, this work was a step towards understanding how microbial succession occurs in marine environments.

Keywords: Microbial Succession, Marine Microbiology, Hexadecane, Molecular Biology

RESUMO PARA LEIGOS

JULIANA CASARES MANDARINO RIBEIRO

ESTUDO DA SUCESSÃO MICROBIANA EM AMBIENTES MARINHOS

Orientador:

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Neste projeto visamos maior entendimento sobre como a comunidade microbiana se comporta em ambientes marinhos. Nossa hipótese é que alterações nas condições ambientais possam causar perda de diversidade microbiana. Dessa maneira, nosso estudo pretende avaliar se: (i) a volta de um ambiente que sofreu um impacto para seu jeito anterior levaria a volta da comunidade microbiana a ser como era também, (ii) se microrganismos de um local diferente podem servir como remodeladores da comunidade microbiana de um ambiente impactado, e (iii) se a perda de microrganismos em um local pode levar a extinção deles. Para atingir esses objetivos, nosso estudo montou 2 recipientes controlados, denominados biorreatores. Na montagem deles 3 biorreatores receberam água marinha contaminada com hexadecano, composto presente no petróleo, e 1 recebeu água marinha sem contaminante, tendo cada biorreator totalizado 400 ml de água (contaminada ou não). A cada 2 dias o conteúdo deles foi parcialmente trocado representando 4 tratamentos: (i) iniciado com água marinha + água marinha esterilizada, (ii) iniciado com água marinha contaminada + água marinha, (iii) iniciado com água marinha contaminada + água marinha esterilizada, e (iv) iniciado com água marinha contaminada + água marinha esterilizada + comunidade microbiana de solo. Os estudos nesses recipientes foram feitos por 16 dias e a análise da comunidade microbiana foi dividida igualmente em dois períodos: período inicial (1) e período final (2). Foram feitas as análises de alfa diversidade – número e abundância de espécies- e de beta diversidade – composição e abundância dentro da comunidade microbiana- para avaliar como a comunidade reagiu aos diferentes tratamentos recebidos. No geral, nossos resultados mostraram que: (i) avaliando a

alfa diversidade a contaminação ambiental não resultou em perda estatisticamente significativa na diversidade das comunidades microbianas, porém através das análises de beta diversidade foi visto que as composições e as estruturas foram alteradas; (ii) o banco de diversidade microbiana de outro local (solo) não gerou um aumento de diversidade na comunidade marinha, tendo apresentado uma queda da mesma em uma análise, (iii) a perda de diversidade não se demonstrou irreparável, visto que as comunidades microbianas dos recipientes- mesmo no curto prazo de estudo- se demonstrou capaz de manter a diversidade presente .

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
RESUMO PARA LEIGOS	xi
1 INTRODUÇÃO	14
1.1. Influência antrópica no meio ambiente	14
1.2. Alteração ambiental, seleção natural e extinção	16
1.3. Ecologia microbiana	18
1.4. Microbiologia marinha	19
2 Justificativa	20
3 Objetivo	20
3.1 Objetivos Gerais	20
3.2 Objetivos específicos	21
4. Material e Métodos	21
4.1. Área de estudo e amostragem das águas	21
4.2 Montagem dos biorreatores	21
4.3. Simulação de eventos de dispersão	23
4.4. Análise por técnicas moleculares	24
4.4.1 Análise por reação em cadeia da Polimerase	24
4.4.2. Sequenciamento e análise de DNA	24
5. Resultados	25
5.1. Análise de alfa diversidade	26
5.2. Análise de beta diversidade	33
6. Discussão	39
7. Conclusão	43
8. Referências Bibliográficas	43

1. Introdução

1.1. Influência antrópica no meio ambiente

O planeta Terra, como conhecemos hoje, é resultado de milhares de anos de processos co-evolutivos entre diferentes ambientes que passaram, ao longo das eras geológicas, por diversas alterações. As mudanças nas condições ambientais do planeta foram consequências de variações extremas de temperatura, movimento tectónico e magmático (que deslocaram lenta e continuamente os continentes), ventos, raios, queda de meteoros, entre muitos outros processos naturais que foram moldando, involuntariamente, o meio ambiente. Entre cada um desses ciclos de mudanças das condições ambientais, ao longo do tempo, o planeta alcançava condições permissíveis para o equilíbrio ecológico (Andreoli *et al.*, 2014). Hoje em dia já é reconhecido que vivemos o período geológico do Antropoceno. Nele, as atividades antrópicas têm afetado, globalmente, as condições de processos geológicos, atmosféricos e hidrosféricos do planeta Terra (Silva e Arbilla, 2018). Nesse caso, as atividades antrópicas viraram uma força que compete com as forças naturais causando mudanças ambientais de difícil conversão, ou, até mesmo, irreversíveis.

Um dos impactos das atividades antrópicas é na biodiversidade, pois as alterações ambientais causam desequilíbrio entre populações e podem levar à extinção de diferentes espécies. Segundo especialistas em Biologia da Conservação, o impacto das ações antrópicas pode levar à sexta extinção em massa de biodiversidade (Braga, 2018). Braga (2018) também alude ao fato de que os cinco ciclos de extinções em massa que ocorreram anteriormente na Terra tiveram como causa processos naturais e que, posterior a cada ciclo, a Terra demorou dezenas de milhões de anos para conseguir recuperar os níveis de biodiversidades pré-existentes. Portanto, os efeitos do antropoceno na redução da riqueza de espécies contemporâneas, por conta dos hábitos da sociedade, levarão, caso as alterações antrópicas sejam interrompidas ou minimizadas, milhares de anos para serem recuperados.

Entretanto, atualmente as alterações antrópicas são constantes e crescentes. O crescimento da população humana, por exemplo, leva a ocupação de novas áreas (para habitação, produção de insumos, turismo ou outros) que são tidas como habitats para diferentes espécies, sendo esse um dos padrões comportamentais humanos prejudiciais ao ambiente. A apropriação desses locais acaba sendo disruptiva para as espécies presentes e altera padrões de dispersão, levando a uma alteração de dinâmicas populacionais que pode gerar extinção (Ewers e Didham, 2005).

Um dos principais casos prejudiciais de ação antrópica é a exploração e uso de produtos que são potenciais poluidores do ambiente. O uso do petróleo como combustível, que é um dos mais importantes recursos que impulsionam a economia global, é um exemplo. A exploração, manipulação, transporte e o uso de derivados do petróleo resultam em contaminações ambientais que podem afetar o meio ambiente e a biodiversidade (Cerqueda-Garcia, 2020). Recentemente, em novembro de 2019, no Brasil, um derramamento de petróleo no oceano Atlântico levou à contaminação de uma extensa faixa litorânea do país (atingindo o litoral do norte, nordeste e sudeste do Brasil) (Pena *et al.*, 2020). Quando acidentes como este ocorrem, há contaminação dos ambientes naturais, afetando diretamente os seres vivos neles presentes - macro ou microrganismos - e podendo afetar, indiretamente, os demais seres vivos que não o habitam nos ambientes contaminados. Por exemplo, muitas vezes a contaminação pode ser carregada através da cadeia trófica.

Contudo, não são apenas grandes acidentes, que ocorrem esporadicamente, que impactam o ambiente. Por exemplo, o descarte rotineiro de materiais plásticos, que derivam do petróleo e são usados demasiadamente no antropoceno, no meio marinho leva ao acometimento de muitos seres que vivem nesse ambiente. A produção, a longo prazo, de microplásticos (pedaços de plástico inferiores a cinco milímetros de diâmetro) que, por ser de fácil ingestão para organismos, leva à bioacumulação na cadeia alimentar, acomete organismos marinhos e terrestres (Silva *et al.*, 2021). Por outro lado, o aterramento desses materiais plásticos ou o depósito em lixões gera prejuízo aos solos, enquanto a queima desses materiais gera gases poluentes para atmosfera (Silva *et al.*, 2021).

Observando o planeta Terra como um ecossistema, os seres humanos, além das atividades petroleiras e do uso de plásticos, utilizam de diversos outros recursos naturais e/ou sintéticos que geram poluentes sólidos, líquidos e gasosos em grandes quantidades, afetando todos os ambientes da nossa biosfera. Por exemplo, as indústrias, assim como os transportes com base em combustíveis fósseis, emitem gases poluentes que causam a poluição atmosférica. A poluição atmosférica, por sua vez, pode alterar os padrões climáticos de cada região, além de afetar as frequências e a persistência de neblinas que, em conjunto com as partículas poluentes no ar, alteram a transmissão de luz pela atmosfera, levando a um problema não só de visibilidade como, também, a retenção de calor. Esses fatores auxiliam no acometimento das propriedades atmosféricas, causando um desbalanceamento (Stern, 1977). Fatores antropogênicos ligados à emissão de gases-estufa, têm participação considerável no aquecimento global, que é um fenômeno climático causado pelo aumento da temperatura média superficial global. Os gases responsáveis pelo efeito estufa absorvem parte da radiação

infravermelha e a irradiam novamente para a superfície, que acaba recebendo quase o dobro de calor e resultando num aumento do aquecimento global, como dito anteriormente. Dessa forma, quanto maior a produção de gases estufa, mais retenção de calor e, logo, aumento do aquecimento global (da Costa Silva e de Paula, 2009).

A consequência destes eventos é que, à medida em que a média de temperatura terrestre sobe, os oceanos se tornam mais quentes também. Assim, com a elevação da temperatura dos ecossistemas marinhos, existe uma necessidade súbita de adaptação da flora e fauna. Os efeitos mais significativos do aquecimento global têm se refletido no acometimento de corais, onde o aumento de temperatura, mesmo que relativamente pequeno, tem levado ao aumento da incidência de eventos de branqueamento. A explicação para esses eventos se deve ao fato de que algas fotossintéticas, que participam de uma relação vital para os corais, os fornecendo alimentação enquanto aproveitam do abrigo que os corais as proporcionam, podem não resistir à variação de temperatura. O fenômeno do branqueamento tem esse nome pois muitas vezes as algas fotossintéticas são as responsáveis pela coloração dos corais, e, com a morte delas, os corais ficam esbranquiçados (Leão *et al.*, 2008). Portanto, os efeitos das alterações ambientais causadas pelo antropoceno podem ser de curto prazo, causando impactos pontuais e reversíveis, mas também podem se prolongar, mudando a diversidade do ambiente permanentemente (Peterson *et al.*, 2003).

1.2. Alteração ambiental, seleção natural e extinção

Variações nas características ambientais tendem a afetar a relação dos organismos presentes no ambiente avaliado. Esforços prévios, principalmente avaliando alterações de temperatura e na oferta de nutrientes, mostraram que qualquer alteração nas condições ambientais pode afetar as comunidades microbianas (Cullen, 1991; Kirchman *et al.*, 1995; Morris *et al.*, 2005; Fuhrman *et al.*, 2006; Fuhrman, 2009; Gilbert *et al.*, 2009). As alterações ambientais podem ocorrer por meios naturais (atividade vulcânica, tempestades, raios, movimentos de placas tectônicas, furacões, tsunamis, meteoros, entre outros) ou devido a ação humana. Embora as alterações ambientais causadas por ações antrópicas possuam, a princípio, impactos locais (contaminação de solo e/ou desmatamento florestal, por exemplo), a sua constância e intensidade podem aumentar a incidência de alterações ambientais causadas por eventos naturais.

Uma vez que o ambiente é alterado, os organismos que estão presentes nesse ambiente são impactados pelas mudanças no seu habitat, e podem não conseguir se adaptar, levando a

uma perda de diversidade no local. As espécies que são afetadas com a mudança das características ambientais, caso não estejam dispersas em outras áreas, podem se tornar extintas. Segundo a metodologia feita no Brasil pela União Internacional para Conservação e Natureza (UICN), existem diferentes categorias de risco de extinção. As categorias dos táxons avaliados e aplicáveis são gradativamente: Menos Preocupante, Quase Ameaçada, Vulnerável, Em Perigo, Criticamente em Perigo, Regionalmente Extinta, Extinto na Natureza e Extinta. Dentre as três categorias mais graves, se considera uma espécie “extinta” quando não há mais indivíduos vivos dessa mesma espécie; “extinta na natureza” quando não há mais indivíduos da espécie fora de cativeiro ou cultivo; e “regionalmente extinta” quando não há mais indivíduos da espécie na região, sendo, por exemplo, o Brasil considerado uma região nessa avaliação. As outras categorias são definidas de acordo com diversos critérios (como área de ocupação, flutuação acentuada, declínio continuado, tempo geracional, entre outros) avaliando seu risco de sobrevivência (ICMBio, 2013). A ausência de uma espécie comum a um ambiente ou, até mesmo, a redução numérica de uma determinada população são capazes de desbalancear o equilíbrio do ecossistema, acometendo sua autorregulação (LACY *et al.*, 2005 *apud* Andreoli *et al.*, 2014).

A preocupação com a pluralidade e abundância dos organismos presentes em ambientes naturais muitas vezes é resumida apenas aos macro-organismos, e é excluída a importância da comunidade microbiana do local (Andreoli *et al.*, 2014). A contradição da ausência de estudos sobre os efeitos permanentes do impacto antropogênico na diversidade microbiana é que os microrganismos são essenciais para a manutenção das características ambientais do planeta. Ou seja, a diminuição da diversidade microbiana pode resultar na alteração das condições ambientais, comprometendo todos os organismos vivos. Num mundo hipotético com a extinção de bactérias e arqueias, por exemplo, processos como o de decomposição dificilmente seriam finalizados e ocorreriam transformações nas condições ambientais do meio em que vivemos. Sendo assim, a maioria dos seres vivos não conseguiriam sobreviver num mundo sem a presença de bactérias e arqueias, ao menos que ocorra uma interferência humana via adição de substâncias químicas e criação de processos artificiais para realização de atividades que são exclusivas do metabolismo microbiano (Gilbert e Neufeld, 2014).

Portanto, estudar os microrganismos em diferentes ambientes e determinar como o estresse causado pelas mudanças nas condições ambientais afeta a diversidade microbiana, é necessário.

1.3. Ecologia microbiana

Há uma grande diversidade microbiana presente em variados ecossistemas e, cada vez mais, há um esforço para compreendê-las. Apenas após a introdução de técnicas moleculares, que ainda são consideradas métodos recém desenvolvidos, que se tornou possível uma melhor descrição de comunidades microbianas presentes em ambientes naturais (Fierer e Jackson, 2006; Rusch *et al.*, 2007; Costello *et al.*, 2009; Caporaso *et al.*, 2011). Entretanto, muitos pontos da ecologia microbiana ainda são desconhecidos e é necessário compreender fatores que determinam a abundância, distribuição e diversidade de organismos em escalas espaciais e temporais para avançar com o conhecimento sobre ela. Enquanto muitas regras já foram estabelecidas para reconhecer os padrões da macroecologia, ainda não se sabe se as mesmas podem ser utilizadas para os microrganismos. Definir quais regras macroecológicas são universais auxilia no entendimento dos mecanismos comuns que afetam a montagem de comunidades, respostas à mudança global e recuperação de distúrbios induzidos pelo homem - antropoceno- (Dickey *et al.*, 2020).

Comunidades microbianas podem ser melhores estruturadas do que os macroorganismos, tendo vários processos ecológicos que potencialmente contribuem para a ordem das comunidades, como: competição, habitat, efeitos históricos e processos neutros, que podem, inclusive, determinar padrões de co-ocorrência não aleatório entre diferentes comunidades microbianas (Fuhrman, 2009).

Cada ambiente é constituído por suas particularidades físicas e químicas, e as características do meio influenciam de inúmeras formas os seres vivos nele presentes. Em geral, as espécies que se adequaram a determinada conjuntura ambiental tendem a prevalecer e se adaptar a esse ambiente, assim como descrito por Darwin na teoria da Seleção Natural (Darwin, 1859). Sendo assim, as distribuições das espécies em um dado ambiente devem-se, principalmente, à sua adaptação às características ambientais, incluindo as relações com outros seres que nele habitam, e ao seu sucesso reprodutivo. Porém, outro fator também está relacionado a colonização de organismos vivos a um determinado ambiente: a dispersão (Hubbell, 2001 *apud* Cassemiro e Padial, 2008).

O conceito de dispersão pode ser definido como a capacidade de populações alcançarem novos locais além do seu ponto de origem, sejam eles distantes ou próximos, compreendendo não apenas o deslocamento físico como também o estabelecimento e a capacidade de colonizar a nova área geográfica alcançada (Ramette e Tiedje, 2007). A dispersão é um dos conceitos relacionados com a teoria da biogeografia, que tem foco em compreender a distribuição da diversidade dos organismos vivos e os mecanismos (especiação, extinção,

interação entre espécies e dispersão) responsáveis pela manutenção e surgimento da diversidade em um dado ambiente (Martiny *et al.*, 2006). Uma das discussões que a biogeografia propõe é que os microrganismos são amplamente distribuídos (todas as espécies estão presentes em todos os lugares), porém as condições ambientais selecionam as espécies dominantes (Azevedo e Farjalla, 2010). Caso esse pressuposto seja verdadeiro, qualquer ambiente pode servir de banco de diversidade microbiana. Ou seja, a perda de diversidade de um ambiente impactado pode ser revertida através da dispersão da comunidade microbiana de um ambiente qualquer (não existiria perda de diversidade microbiana na Terra). Entretanto, essas teorias da ecologia microbiana necessitam de mais estudos.

1.4. Microbiologia marinha

O ambiente marinho é o maior habitat do planeta Terra, sendo responsável por ocupar mais de 90% do volume territorial. Assim, os oceanos abrigam uma complexa diversidade de microrganismos, sendo esses microrganismos os responsáveis por aproximadamente 50% da produção primária global de matéria orgânica (Lauro *et al.*, 2009). Os microrganismos marinhos também são fundamentais para os ciclos biogeoquímicos que ocorrem nos oceanos (como o do carbono, nitrogênio e potássio) e que influenciam, além do próprio ambiente marinho, os ambientes terrestres e a atmosfera (Whitman *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2011;).

Pela extensão territorial que ocupa, o ambiente marinho tem muitas variantes importantes como: temperatura, salinidade, nível de nutrientes, presença de luz, pressão, entre outros (Lauro *et al.*, 2009; Muller-Karger *et al.*, 2018). Dependendo da profundidade e/ou localização, as condições físicas e químicas desses ambientes podem ser extremas. Entretanto, diferentes microrganismos extremófilos conseguem habitar esses ambientes (Emiliani *et al.*, 2018). Além dos extremófilos e mesófilos planctônicos, os procariotos marinhos também se encontram em simbioses (com microrganismos e/ou macrorganismos), trazendo uma nova gama de diversidade e incorporando características metabólicas nas espécies que estão associadas, assim como tornando mais complexos os estudos da biodiversidade marinha (Cavanaugh, 1994).

O estudo dos microrganismos marinhos e suas moléculas nas últimas décadas tem aumentado muito e, devido à enorme variedade de procariotos marinhos e de suas condições de vida, os oceanos são um enorme potencial para enzimas e metabólitos para uso biotecnológico, em ramos como a saúde, indústrias, ambiente, entre outros. Com a evolução das tecnologias de robótica (que faz com que amostras de ambientes remotos possam ser estudadas) e de análise de comunidades microbianas se espera o aumento na incidência da descoberta de novas espécies

e genes em ambientes marinhos (Debashish *et al.*, 2005; Emiliani *et al.*, 2018). Entretanto, as alterações nas condições ambientais podem alterar a composição microbiana e diminuir a diversidade microbiana em ambientes marinhos. Sendo assim, o foco do nosso estudo está em analisar a sucessão microbiológica presente em ambientes marinhos posterior a impactos causados pela influência antrópica.

2. Justificativa

As ações antrópicas são cotidianas e acontecem em um ritmo vertiginoso trazendo, dessa forma, numerosas alterações ao nosso planeta. O ambiente marinho não é isento dessas mudanças no período antropoceno, sendo muitas vezes impactado por transformações súbitas. Compreender como comunidades microbianas interagem no surgimento de condições ambientais diferentes é de suma importância para avançar o conhecimento da diversidade dos oceanos e das populações que neles habitam.

Os microrganismos têm sido coadjuvantes em diversos tópicos de ecologia, como especiação, extinção e interação entre espécies. Recentemente mais estudos têm sido realizados sobre temas relacionados à ecologia microbiana, mas ainda se faz necessário mais deles, para ter mais confiança nos conceitos estabelecidos. O efeito de alterações ambientais na diversidade microbiana ainda é em parte desconhecido. Por exemplo, embora se saiba que a alteração nas condições ambientais de oceanos pode promover a alteração na composição microbiana, ainda se necessita de estudos que avaliam se a regeneração das condições ambientais é associada à reestruturação da diversidade microbiana. Não se sabe, por exemplo, se a perda de diversidade marinha é irreparável ou se amostras de outras origens podem ser utilizadas como banco de dados de diversidade microbiana. Dessa maneira, há a necessidade de que tenhamos cada vez mais pesquisas sobre ecologia microbiana para que se entenda melhor as consequências das alterações globais causadas pela atividade antrópica na diversidade microbiana.

3. Objetivo

3.1. Objetivos gerais

Os objetivos deste estudo são: (i) avaliar se a regeneração de um ambiente marinho com hidrocarbonetos do petróleo resultará na regeneração da diversidade microbiana; (ii) determinar se um ambiente exógeno pode servir como banco de diversidade microbiana para recolonização de um ambiente impactado; e (iii) avaliar se a perda de diversidade microbiana é irreparável (extinção).

3.2. Objetivos específicos

- i. Simular a contaminação de ambientes marinhos com hexadecano (hidrocarboneto majoritário do petróleo);
- ii. Avaliar o impacto da contaminação com hexadecano na diversidade microbiana;
- iii. Avaliar se a regeneração do ambiente impactado (remoção do contaminante) causará a regeneração da diversidade microbiana.
- iv. Avaliar o efeito da adição de uma comunidade microbiana exógena (banco de diversidade microbiana) para recolonização de um ambiente marinho impactado;
- v. Aferir se a perda de diversidade microbiana é irreparável, ou seja, leva à extinção.

4. Material e Métodos

4.1. Área de estudo e amostragem das águas

Todas as amostras de água utilizadas nesse estudo foram coletadas na Praia da Barra da Tijuca, no Rio de Janeiro - RJ. As coletas de água marinha foram feitas semanalmente, durante um período de 21 dias. Para coleta foram utilizados recipientes de cinco litros previamente esterilizados. Em todos os casos, as amostras foram levadas imediatamente para o laboratório.

Em parte dos processos é necessário utilizar água marinha esterilizada e, para isso, foi realizada filtração de parte das águas marinhas coletadas em um sistema a vácuo utilizando membrana Millipore de 0,22 μm (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). Dessa maneira, a água marinha esterilizada foi provinda do mesmo ambiente que a não esterilizada, mantendo semelhantes condições ambientais.

4.2. Montagem dos biorreatores

Anterior a montagem dos biorreatores, foram montados dois pré-biorreatores em frascos de 1 litro contendo 700 ml de água do mar, conforme ilustrado na **Figura 1**. Um desses pré-biorreatores foi contaminado com 0,001% de hexadecano. O hexadecano foi utilizado como contaminante pois é um dos hidrocarbonetos majoritários presente no petróleo (um dos principais poluentes de ambientes marinhos). Os pré-biorreatores foram incubados por 7 dias, em temperatura ambiente e sob agitação constante.

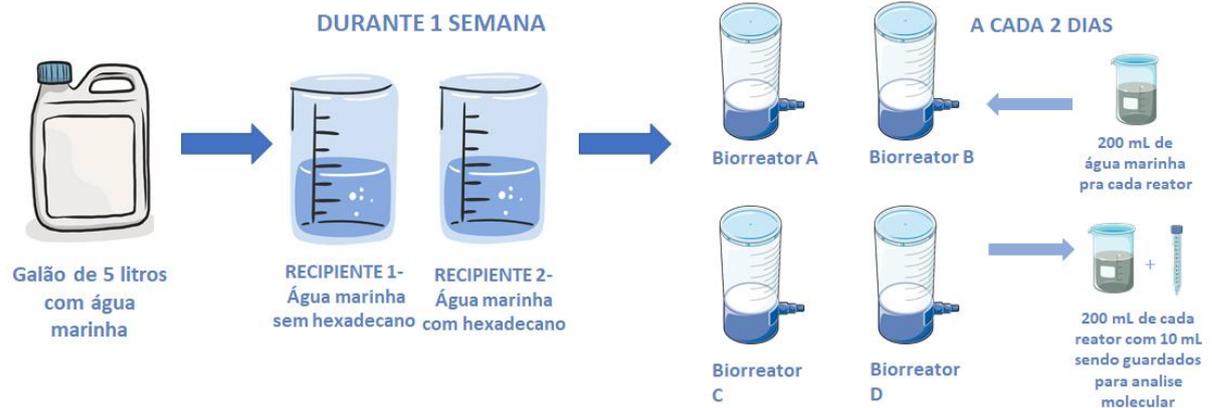


Figura 1- Esquema de pré-montagem e montagem dos biorreatores, ilustrando também o processo de troca de água marinha feita a cada dois dias para simulação do evento de dispersão no ambiente natural.

Após os 7 dias em constante movimento, o material dos pré-biorreatores foi utilizado para montagem dos 4 biorreatores, de maneira que: o biorreator A recebeu 200 ml de água marinha não contaminada, enquanto os biorreatores B, C e D receberam, cada um, 200 ml de água marinha contaminada com hexadecano. Todos os biorreatores foram acrescidos de 200 ml de água marinha (o volume final de cada biorreator foi de 400 ml), sendo que os biorreatores B e D receberam água marinha esterilizada.

Os biorreatores, então, ficaram divididos em quatro grupos (**Quadro 1**): A (água marinha alimentada com água marinha); B (água marinha + hexadecano alimentada com água marinha esterilizada + comunidade microbiana de solo), C (água marinha + hexadecano alimentada com água marinha) e D (água marinha + hexadecano alimentada com água marinha esterilizada). A metodologia da amostra de solo será descrita mais abaixo.

Quadro 1 – Descrição dos conteúdos dos Biorreatores e os componentes que foram introduzidos neles

Biorreator	Conteúdo Inicial	Adições durante a progressão do projeto
A (A_AE)	Água marinha	Água marinha esterilizada
B (C_AES)	Água marinha + Hexadecano	Água marinha esterilizada + amostra de solo
C (C_A)	Água marinha + Hexadecano	Água marinha
D (C_AE)	Água marinha + Hexadecano	Água marinha esterilizada

Na progressão do projeto, que teve duração de 16 dias, a cada 2 dias foi feita a renovação parcial de água dos biorreatores, de forma a simular a renovação da água marinha pelo movimento das marés. Durante essa renovação, 200 ml de água foram retirados dos biorreatores. Em seguida, o mesmo volume de 200 ml de água marinha foi repostado em cada biorreator (sendo que os reatores B e D receberam água marinha esterilizada). Em todos os eventos de renovação dos biorreatores, 50 ml da água retirada de cada biorreator foi armazenada a - 20 °C em tubos tipo Falcon para posterior estudo da comunidade microbiana.

4.3. Simulação de eventos de dispersão

A simulação de eventos de dispersão foi realizada a partir da adição de comunidades microbianas exógenas no biorreator B. A partir desse experimento era esperado que fosse possível observar se um ambiente exógeno pode servir como banco de diversidade microbiana para regeneração de um ambiente impactado. Para isso, 10 g de solo que não era de superfície foram coletadas, em um recipiente previamente esterilizado, no gramado localizado à margem do bloco I do prédio do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, na Ilha do Fundão. Posteriormente, 1 g de solo foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 ml, também esterilizado. No mesmo tubo tipo Falcon foram adicionados 10 ml de água do mar esterilizada para ressuspender a comunidade microbiana presente no solo (**Figura 2**). O tubo tipo Falcon foi colocado em agitação por 10 minutos, seguido, também, de 10 minutos em repouso para sedimentação do solo. Uma alíquota de 1 ml da parte líquida foi retirada e separada para uso, enquanto o restante foi guardado para futura análise molecular.

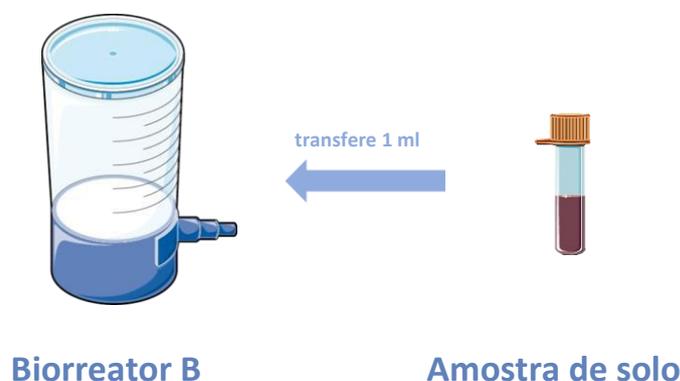


Figura 2- Procedimento específico do Biorreator B, que contém água marinha e hexadecano, em que será adicionado 1ml de amostra de solo como a comunidade exógena de escolha para avaliar se um ambiente exógeno pode servir como banco de diversidade microbiana para regeneração de um ambiente impactado.

4.4 Análise por técnicas moleculares

A extração do DNA bacteriano foi feita com base no kit FastDNA Spin Kit for soil, seguindo as instruções do fabricante. Para isso, foram filtrados 20 ml de cada amostra em membranas Millipore de 0,22 µm (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) para obtenção das células microbianas. Estas membranas, contendo a comunidade microbiana de cada amostra, foram utilizadas para a extração do DNA.

4.4.1 Análise por reação em cadeia da Polimerase

As reações de PCR foram realizadas utilizando os iniciadores PA (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e PH (5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'), conforme descrito por Massol-Deya e colaboradores (1995). Cada reação foi realizada com um volume final de 25 µl em um tubo contendo 5 µl de tampão GoTaq® Flexi (Promega®) (1X), 1,5 µl MgCl₂ (1,5mM), 0,5 µl dNTP (1mM), 0,5 µl de cada primer (1µM), 0,2 µl Taq polimerase (2,5U), 1,0 µl (50-100 ng) de DNA molde e água MilliQ estéril q.s.p. 25 µl. O ciclo aplicado foi: 1 x (4 min a 95 °C); 34 x (15 seg a 94 °C, 35 seg a 48 °C, 30 seg a 72 °C); 1 x (5 min a 72 °C); após a reação da PCR, as amostras foram estocadas a temperatura de -20 °C e a análise da amplificação foi através de eletroforese em gel de agarose. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,4% (p/v) preparado em tampão TBE e adicionado do corante SYBR®Safe (Thermofisher®), para então aplicar as amostras no gel. Foi utilizado o marcador de peso molecular "1Kb Plus DNA Ladder" (Promega®). A corrida dos produtos foi realizada a 90 V por 40 minutos em tampão TEB 1X, em seguida, observados sob a luz UV.

4.4.2. Sequenciamento e análise de DNA

O DNA total das amostras foi identificado molecularmente por meio do sequenciamento de parte do gene *rrs* utilizando a plataforma Illumina MiSeq (<http://novogene.egnyte.com>). Toda análise das sequências obtidas foi realizada através da plataforma QIIME 2 (BOLYEN et al., 2018). Primeiramente, as extremidades *paired-ends* das sequências de cada amostra foram montadas originando sequências de aproximadamente 250 pares de base (pb). Em seguida, diferentes etapas de controle de qualidade foram realizadas, como a exclusão de sequências de baixa qualidade, exclusão de sequências que não apresentem o tamanho esperado e exclusão de sequências relacionadas a quimeras. Posteriormente a essas etapas, as sequências de cada amostras foram classificadas em Variantes de Sequências Amplificadas (ASV, do inglês

Amplicon Sequence Variants). A partir dessa informação, foram calculados os índices de alfa diversidade de Shannon e o índice de diversidade filogenética Faith-PD. Análises não paramétricas de Kruskal-Wallis foram realizadas para comparar os valores dos índices de alfa diversidade observado em cada amostra. Adicionalmente, análises de beta diversidade baseadas nas métricas weighted- e unweighted Unifrac foram realizadas seguidas de análises das coordenadas principais (PCoA, do inglês *Principal Coordinates Analysis*). Por fim, análises de PERMANOVA foram realizadas para avaliar a estrutura da comunidade microbiana.

5. Resultados

Para análise dos resultados foram utilizadas amostras coletadas ao longo dos 16 dias de funcionamento de cada biorreator, assim como as amostras da água marinha e da amostra de solo. As amostras dos biorreatores foram divididas em Período inicial (amostras coletadas do 18/10 ao dia 25/10) e Período Final (amostras coletadas do dia 28/10 ao dia 04/11) (Figura 3). As análises serão denominadas de acordo com o Quadro 2.

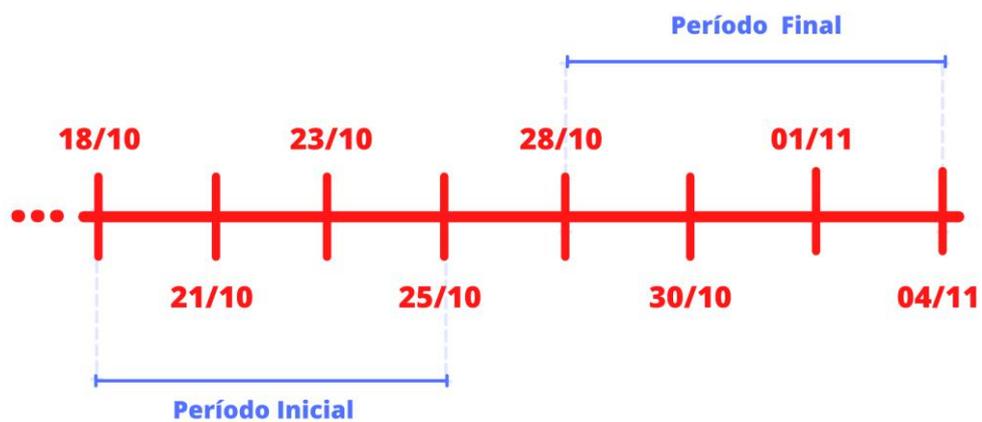


Figura 3- Figura representando a linha do tempo de coletas e indicando os períodos inicial e final de acordo com as datas das coletas. Todas as coletas foram realizadas no ano de 2021. As reticências representam a semana anterior ao início das coletas em que eram usados os pré-biorreatores

A comunidade microbiana presente nos microcosmos foi determinada através de sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S seguido de análise de bioinformática utilizando o programa QIIME2. Primeiramente, todas as sequências obtidas foram filtradas para

exclusão de possíveis sequências quiméricas e, também, de sequências que não apresentavam o tamanho aproximado de 250 pb. Dessa maneira, a análise do sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S resultou em um total de 2291025 sequências, e o número de sequências variou entre 97874, na amostra C_AE2, e 54842, na amostra A_AE1. Foram avaliadas 54842 por amostra. Posteriormente, todas as sequências foram classificadas em Variantes de Sequências Amplificadas (ASVs). Com base na distribuição das diferentes ASVs nas amostras estudadas, a estrutura e composição da comunidade microbiana foi analisada através da comparação da alfa e beta diversidade.

Local de coleta	Momento de coleta	Denominação utilizada
Recipiente de água marinha utilizado antes da mesma ser direcionada aos biorreatores	Ao longo do projeto	A
Biorreator A	Período inicial	A_AE1
Biorreator A	Período final	A_AE2
Biorreator B	Período inicial	C_AES1
Biorreator B	Período final	C_AES2
Biorreator C	Período inicial	C_A1
Biorreator C	Período final	C_A2
Biorreator D	Período inicial	C_AE1
Biorreator D	Período final	C_AE2

Quadro 2- Quadro indicando a relação da nomenclatura utilizada nos métodos e nos resultados do projeto

5.1. Análise de alfa diversidade

O resultado da estimativa de alfa diversidade da comunidade microbiana através da análise do índice de Shannon pode ser observado na Figura 4 e a análise estatística de Kruskal-Wallis pode ser observada na Tabela 1. O resultado mostrou que a média do índice de Shannon variou de 7,45 na amostra C_A1, a 5,70 na amostra C_AE2. De acordo com a análise estatística de Kruskal-Wallis, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os

índices de Shannon observados nas amostras de água marinha (A) e nas amostras do período inicial dos diferentes microcosmos (A_AE1, C_A1, C_AE1 e C_AES1) ($p=0.05$). Por outro lado, o resultado mostrou que os valores do índice de Shannon observados nas amostras A_AE2, C_AE2 e C_AES2 foram estatisticamente menores do que os valores observados nas amostras de água marinha (A) ($p=0.05$) e demonstraram no gráfico serem menores do que os valores nas amostras do tempo inicial dos microcosmos A_AE1, C_A1, C_AE1 e C_AES1. Entretanto, nas amostras C_A não foi observado diferença significativa entre os valores do índice de Shannon observados nos Período inicial e final desse microcosmo.

Tabela 1 - Análise do índice de Shannon observado em cada amostra.

id	Amostra	Período	shannon_entropy
#q2:types	categoryal	categoryal	numeric
JA1	A_AE 18/10	A_AE1	7,31
JA3	A_AE 21/10	A_AE1	7,27
JG2	A_AE 23/10	A_AE1	5,72
JA4	A_AE 25/10	A_AE1	6,51
JA5	A_AE 28/10	A_AE2	5,57
JA6	A_AE 30/10	A_AE2	5,94
JD3	A_AE 01/11	A_AE2	5,71
JD4	A_AE 04/11	A_AE2	5,78
JA2	C_A 18/10	C_A1	7,27
JG1	C_A 21/10	C_A1	7,84
JC1	C_A 23/10	C_A1	7,26
JC3	C_A 28/10	C_A2	7,24
JB2	C_A 30/10	C_A2	7,55
JB3	C_A 01/11	C_A2	7,19
JB4	C_A 04/11	C_A2	7,03
JE1	C_AE 18/10	C_AE1	7,23
JE2	C_AE 21/10	C_AE1	7,64
JE3	C_AE 23/10	C_AE1	6,22
JD2	C_AE 25/10	C_AE1	6,54
JB1	C_AE 28/10	C_AE2	6,10
JE4	C_AE 30/10	C_AE2	4,41
JG4	C_AE 04/11	C_AE2	5,97
JH4	C_AE 01/11	C_AE2	6,34

JD1	C_AES 18/10	C_AES1	7,13
JH1	C_AES 21/10	C_AES1	7,23
JF1	C_AES 28/10	C_AES2	5,90
JF2	C_AES 30/10	C_AES2	6,57
JG3	C_AES 04/11	C_AES2	5,24
A41	A	A	7,71
A42	A	A	6,70
A43	A	A	6,49
A31	A	A	7,10
A32	A	A	7,01

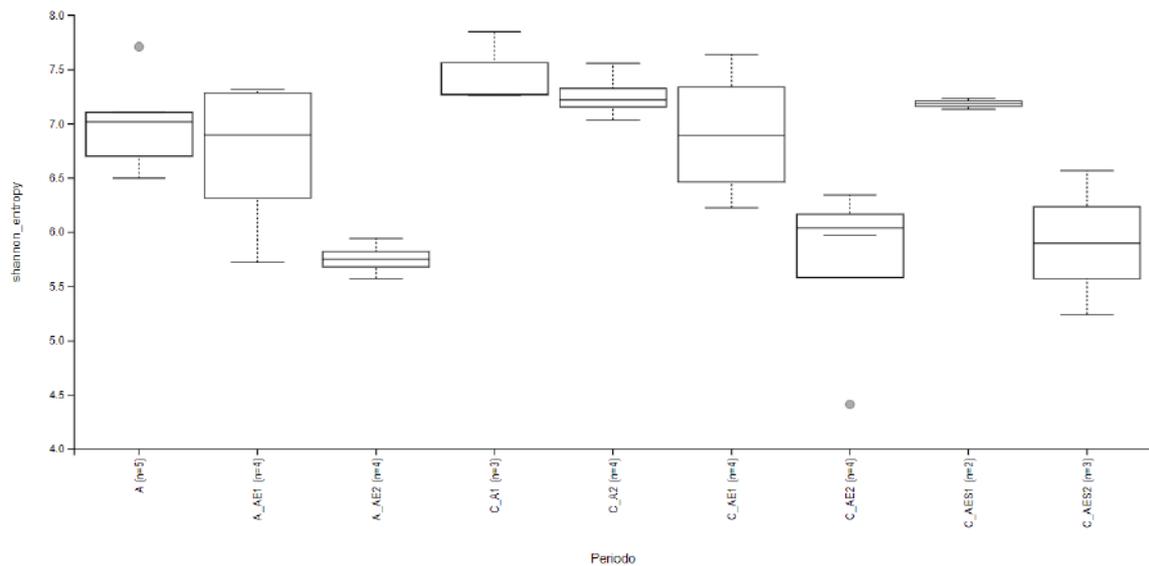


Figura 4- Gráfico de boxplot da distribuição dos valores de estimativa da alfa diversidade (índice de Shannon) observados nas diferentes amostras analisadas no presente estudo. Os círculos preenchidos representam os outliers nas amostras, que são valores de dados que estão muito diferentes dos outros, podendo afetar a análise.

Tabela 2- Análise estatística comparando os valores observados no índice de Shannon através do teste de Kruskal-Wallis. A comparação é feita entre o grupo 1 da tabela com a linha referente ao grupo 2.

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
A (n=5)	A_AE1 (n=4)	0,06	0,81	0,85
	A_AE2 (n=4)	6,00	0,01	0,15
	C_A1 (n=3)	2,69	0,10	0,21

	C_A2 (n=4)	1,50	0,22	0,36
	C_AE1 (n=4)	0,06	0,81	0,85
	C_AE2 (n=4)	6,00	0,01	0,15
	C_AES1 (n=2)	1,35	0,25	0,37
	C_AES2 (n=3)	3,76	0,05	0,17
A_AE1 (n=4)	A_AE2 (n=4)	3,00	0,08	0,19
	C_A1 (n=3)	0,50	0,48	0,66
	C_A2 (n=4)	0,33	0,56	0,72
	C_AE1 (n=4)	0,08	0,77	0,85
	C_AE2 (n=4)	2,08	0,15	0,27
	C_AES1 (n=2)	0,00	1,00	1,00
	C_AES2 (n=3)	1125,00	0,29	0,42
A_AE2 (n=4)	C_A1 (n=3)	4,50	0,03	0,15
	C_A2 (n=4)	5,33	0,02	0,15
	C_AE1 (n=4)	5,33	0,02	0,15
	C_AE2 (n=4)	1,33	0,25	0,37
	C_AES1 (n=2)	3,43	0,06	0,18
	C_AES2 (n=3)	125,00	0,72	0,84
C_A1 (n=3)	C_A2 (n=4)	2,00	0,16	0,27
	C_AE1 (n=4)	2,00	0,16	0,27
	C_AE2 (n=4)	4,50	0,03	0,15
	C_AES1 (n=2)	3,00	0,08	0,19
	C_AES2 (n=3)	3,86	0,05	0,17
C_A2 (n=4)	C_AE1 (n=4)	0,33	0,56	0,72
	C_AE2 (n=4)	5,33	0,02	0,15
	C_AES1 (n=2)	0,21	0,64	0,77
	C_AES2 (n=3)	4,50	0,03	0,15
C_AE1 (n=4)	C_AE2 (n=4)	4,08	0,04	0,17
	C_AES1 (n=2)	0,21	0,64	0,77
	C_AES2 (n=3)	2,00	0,16	0,27
C_AE2 (n=4)	C_AES1 (n=2)	3,43	0,06	0,18
	C_AES2 (n=3)	0,00	1,00	1,00
C_AES1 (n=2)	C_AES2 (n=3)	3,00	0,08	0,19

A Figura 5, apresenta os resultados da estimativa de alfa diversidade com base na diversidade de grupos filogenéticos (Faith-PD). Essa análise mostrou que a média do índice de Faith-PD variou de 111,2 (C_A2) a 82,7 (C_A1). A análise de Kruskal-Wallis dos índices de Faith-PD mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores obtidos nas amostras de água marinha (A) e as demais amostras. Em relação, aos períodos iniciais e finais de cada tratamento, o resultado mostrou que não foram observadas diferenças significativas entre as A_AE, C_AE e C_AES. Por outro lado, foi observado que os valores do índice de Faith-PD foram maiores em C_A2 do que em C_A1 ($P=0,05$).

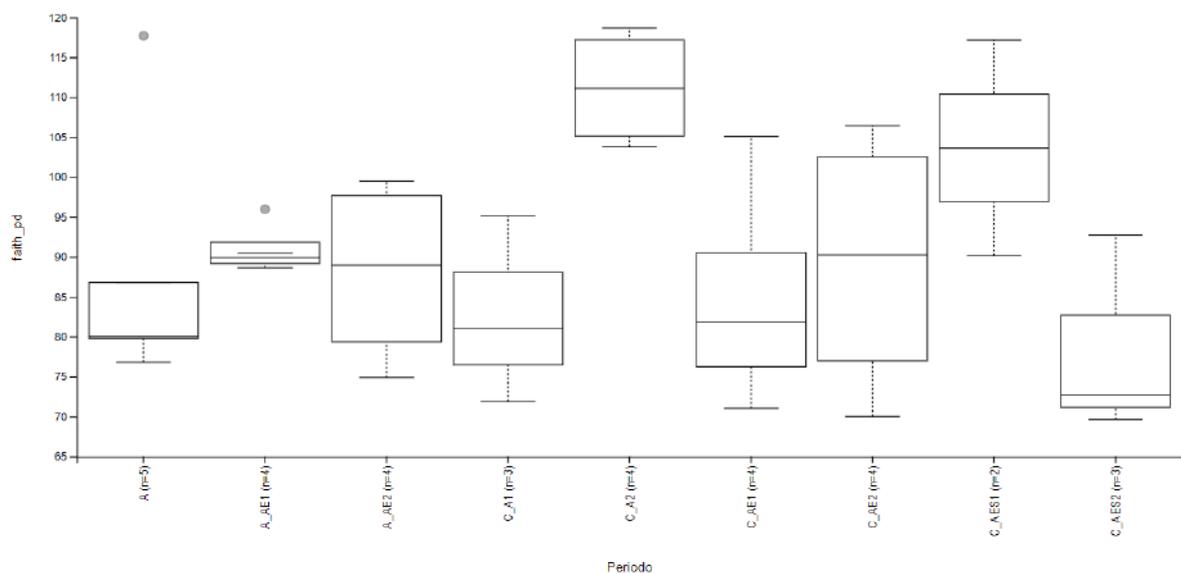


Figura 5- Gráfico de boxplot da distribuição dos valores do índice filogenético de alfa diversidade Faith-PD observados nas diferentes amostras utilizadas neste estudo. Os círculos preenchidos representam os outliers nas amostras, que são valores de dados que estão muito diferentes dos outros, podendo afetar a análise.

Tabela 3- Valores do índice de Faith-PD observado em cada amostra.

id	Amostra	Periodo	faith_pd
JA1	A_AE 18/10	A_AE1	89,37
JA3	A_AE 21/10	A_AE1	95,97
JG2	A_AE 23/10	A_AE1	90,44

JA4	A_AE 25/10	A_AE1	88,63
JA5	A_AE 28/10	A_AE2	74,87
JA6	A_AE 30/10	A_AE2	80,86
JD3	A_AE 01/11	A_AE2	99,47
JD4	A_AE 04/11	A_AE2	97,07
JA2	C_A 18/10	C_A1	81,03
JG1	C_A 21/10	C_A1	95,10
JC1	C_A 23/10	C_A1	71,87
JC3	C_A 28/10	C_A2	116,64
JB2	C_A 30/10	C_A2	118,67
JB3	C_A 01/11	C_A2	105,56
JB4	C_A 04/11	C_A2	103,78
JE1	C_AE 18/10	C_AE1	77,99
JE2	C_AE 21/10	C_AE1	85,68
JE3	C_AE 23/10	C_AE1	71,00
JD2	C_AE 25/10	C_AE1	105,07
JB1	C_AE 28/10	C_AE2	106,42
JE4	C_AE 30/10	C_AE2	70,00
JG4	C_AE 04/11	C_AE2	79,27
JH4	C_AE 01/11	C_AE2	101,21
JD1	C_AES 18/10	C_AES1	117,12
JH1	C_AES 21/10	C_AES1	90,12
JF1	C_AES 28/10	C_AES2	72,64
JF2	C_AES 30/10	C_AES2	92,73
JG3	C_AES 04/11	C_AES2	69,61
A41	A	A	117,67
A42	A	A	80,04
A43	A	A	79,80
A31	A	A	76,77
A32	A	A	86,79

Tabela 4- Análise estatística comparando os valores observados no índice de Faith-PD através do teste de Kruskal-Wallis. A comparação é feita entre o grupo 1 da tabela com a linha referente ao grupo 2.

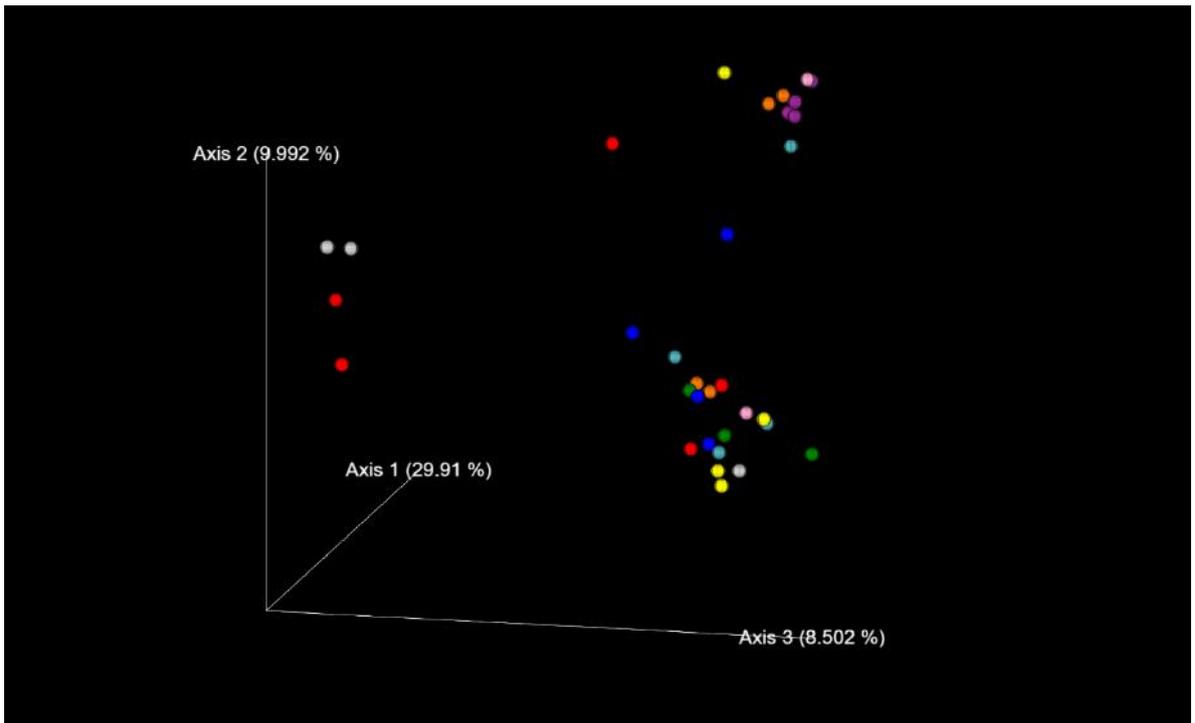
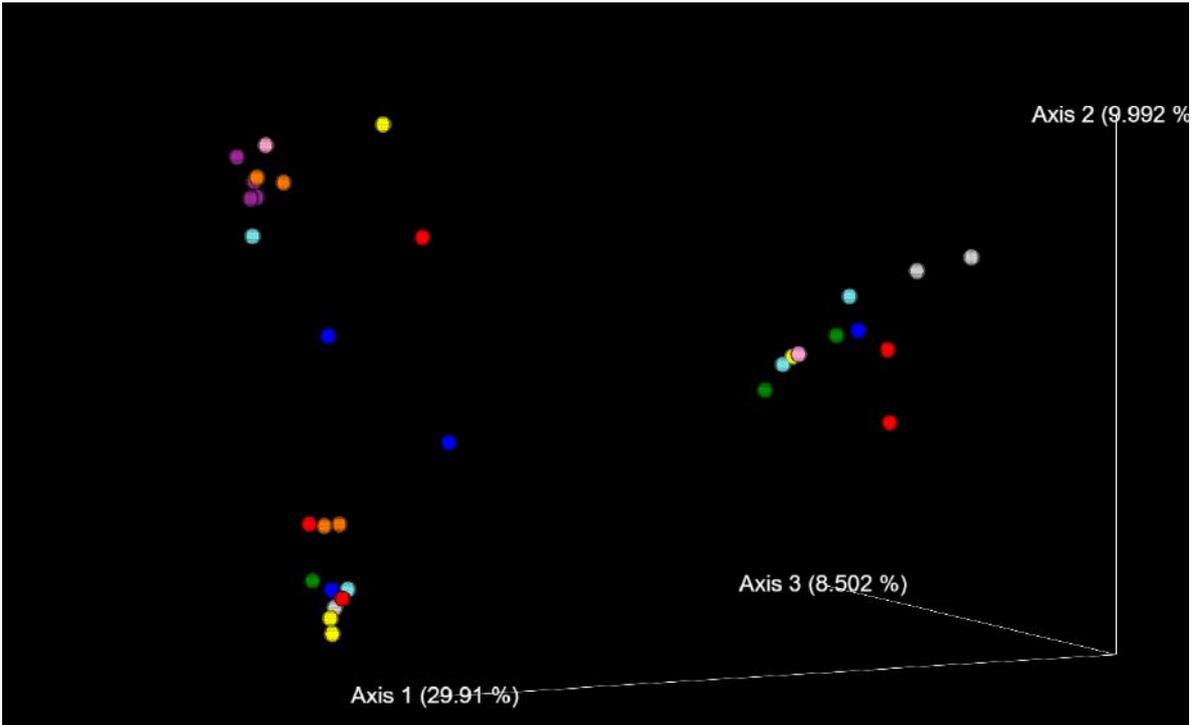
Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
A (n=5)	A_AE1 (n=4)	2,16	0,14	0,59

	A_AE2 (n=4)	0,06	0,81	0,91
	C_A1 (n=3)	0,02	0,88	0,96
	C_A2 (n=4)	2,94	0,09	0,44
	C_AE1 (n=4)	0,24	0,62	0,89
	C_AE2 (n=4)	0,06	0,81	0,91
	C_AES1 (n=2)	1,35	0,25	0,59
	C_AES2 (n=3)	1,09	0,30	0,59
A_AE1 (n=4)	A_AE2 (n=4)	0,00	1,00	1,00
	C_A1 (n=3)	1,13	0,29	0,59
	C_A2 (n=4)	5,33	0,02	0,31
	C_AE1 (n=4)	1,33	0,25	0,59
	C_AE2 (n=4)	0,00	1,00	1,00
	C_AES1 (n=2)	0,86	0,35	0,61
	C_AES2 (n=3)	1,13	0,29	0,59
A_AE2 (n=4)	C_A1 (n=3)	0,50	0,48	0,75
	C_A2 (n=4)	5,33	0,02	0,31
	C_AE1 (n=4)	0,08	0,77	0,91
	C_AE2 (n=4)	0,08	0,77	0,91
	C_AES1 (n=2)	0,86	0,35	0,61
	C_AES2 (n=3)	2,00	0,16	0,59
C_A1 (n=3)	C_A2 (n=4)	4,50	0,03	0,31
	C_AE1 (n=4)	0,00	1,00	1,00
	C_AE2 (n=4)	125,00	0,72	0,91
	C_AES1 (n=2)	1,33	0,25	0,59
	C_AES2 (n=3)	0,43	0,51	0,77
C_A2 (n=4)	C_AE1 (n=4)	4,08	0,04	0,31
	C_AE2 (n=4)	3,00	0,08	0,44
	C_AES1 (n=2)	0,21	0,64	0,89
	C_AES2 (n=3)	4,50	0,03	0,31
C_AE1 (n=4)	C_AE2 (n=4)	0,08	0,77	0,91
	C_AES1 (n=2)	1,93	0,16	0,59
	C_AES2 (n=3)	0,50	0,48	0,75
C_AE2 (n=4)	C_AES1 (n=2)	0,86	0,35	0,61
	C_AES2 (n=3)	1,13	0,29	0,59
C_AES1 (n=2)	C_AES2 (n=3)	1,33	0,25	0,59

5.2. Análise de beta diversidade

As análises de beta diversidade, baseadas na distribuição de ASVs presentes nas diferentes amostras, foram realizadas para avaliar a composição (unweighted Unifrac) e a estrutura da comunidade microbiana (weighted Unifrac). Em todos os casos, a diferença observada entre as amostras foi determinada com a análise de PERMANOVA.

A análise da PCoA, baseada na métrica do unweighted Unifrac, não mostrou uma separação das amostras de acordo com os diferentes tratamentos (Fig 6). Por exemplo, as amostras dos diferentes tratamentos ficaram sobrepostas na ordenação multidimensional (Fig 6). Esse resultado foi confirmado com a análise de PERMANOVA (Tabela 5). Em comparação com a composição da comunidade microbiana das amostras de água marinha (A) somente a amostra C_A2 apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0.05$) (Tabela 5). Diferença estatisticamente significativa da composição da comunidade microbiana também foi observada entre as amostras C_A1 e C_A2, e entre C_A2 e as amostras C_AE1, C_AE2 e C_AES2 (Tabela 5).



■	A
■	A_AE1
■	A_AE2
■	C_A1
■	C_A2

■	C_AE1
■	C_AE2
■	C_AES1
■	C_AES2

Figura 6- Análise de Coordenadas Principais (PCoA) estimada com base na métrica do Unweighted Unifrac. Ambas as figuras mostram mesmo gráfico 3D tendo como diferença apenas a rotação capturada. A terceira parte da figura relaciona cada amostra com sua cor representada no gráfico.

Tabela 5- Teste de PERMANOVA baseado nos resultados de beta-diversidade obtidos com o uso da métrica unweighted-Unifrac. A comparação é feita entre o grupo 1 da tabela com a linha referente ao grupo 2.

Group 1	Group 2	p-value	q-value	
A	A_AE1	0,445	0,64	
	A_AE2	0,168	0,39	
	C_A1	0,188	0,395	
	C_A2	0,003	0,14	
	C_AE1	0,302	0,49	
	C_AE2	0,224	0,39	
	C_AES1	0,479	0,64	
	C_AES2	0,195	0,39	
A_AE1	A_AE2	0,202	0,39	
	C_A1	0,518	666	
	C_A2	0,032	0,14	
	C_AE1	0,615	738	
	C_AE2	0,607	738	
	C_AES1	0,739	0,82	
	C_AES2	0,202	0,39	
	A_AE2	C_A1	0,029	0,14
C_A2		0,031	0,14	
C_AE1		0,152	0,39	
C_AE2		0,124	384	
C_AES1		0,128	384	
C_AES2		0,027	0,14	
C_A1		C_A2	0,035	0,14
		C_AE1	0,341	0,53
	C_AE2	0,789	0,82	
	C_AES1	0,803	0,82	
	C_AES2	0,48	0,64	
C_A2	C_AE1	0,032	0,14	
	C_AE2	0,031	0,14	
	C_AES1	0,063	0,22	
	C_AES2	0,028	0,14	
C_AE1	C_AE2	0,872	872	
	C_AES1	0,801	0,82	
	C_AES2	0,228	0,39	
C_AE2	C_AES1	0,8	0,82	

	C_AES2	0,228	0,39
C_AES1	C_AES2	0,403	0,60

Adicionalmente, a PCoA e a análise de PERMANOVA foram realizadas com base na métrica Weighted UniFrac. A análise de PCoA não mostrou uma nítida separação das diferentes amostras no gráfico multidimensional. Entretanto, a análise de PERMANOVA mostrou que a composição e a estrutura da comunidade microbiana das amostras A_AE2, A_A2, C_AE1, C_AE2 e C_AES2 apresentaram diferenças significativas em comparação com a amostra de água marinha (A) (Fig 7). Embora as amostras A_AE, C_AE e C_AES não tenham apresentado diferença estatisticamente significativa entre os períodos inicial e final, a comparação entre as amostras dos diferentes tratamentos mostrou que a estrutura da comunidade microbiana alterou de acordo com os tratamentos. Por exemplo, a amostra A_AE1 apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação com a amostra C_A2, enquanto a amostra A_AE2 apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação com as amostras C_A1, C_A2 e C_AE1.

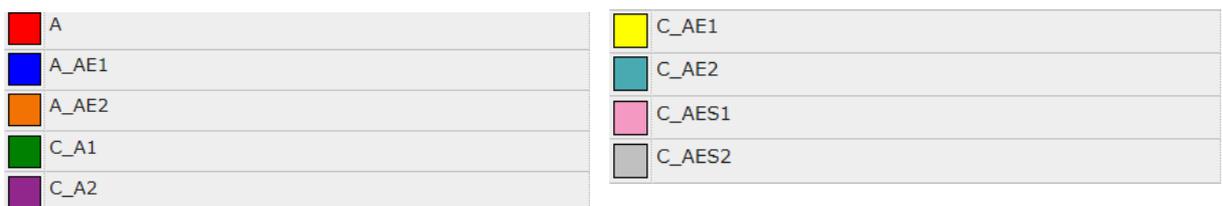
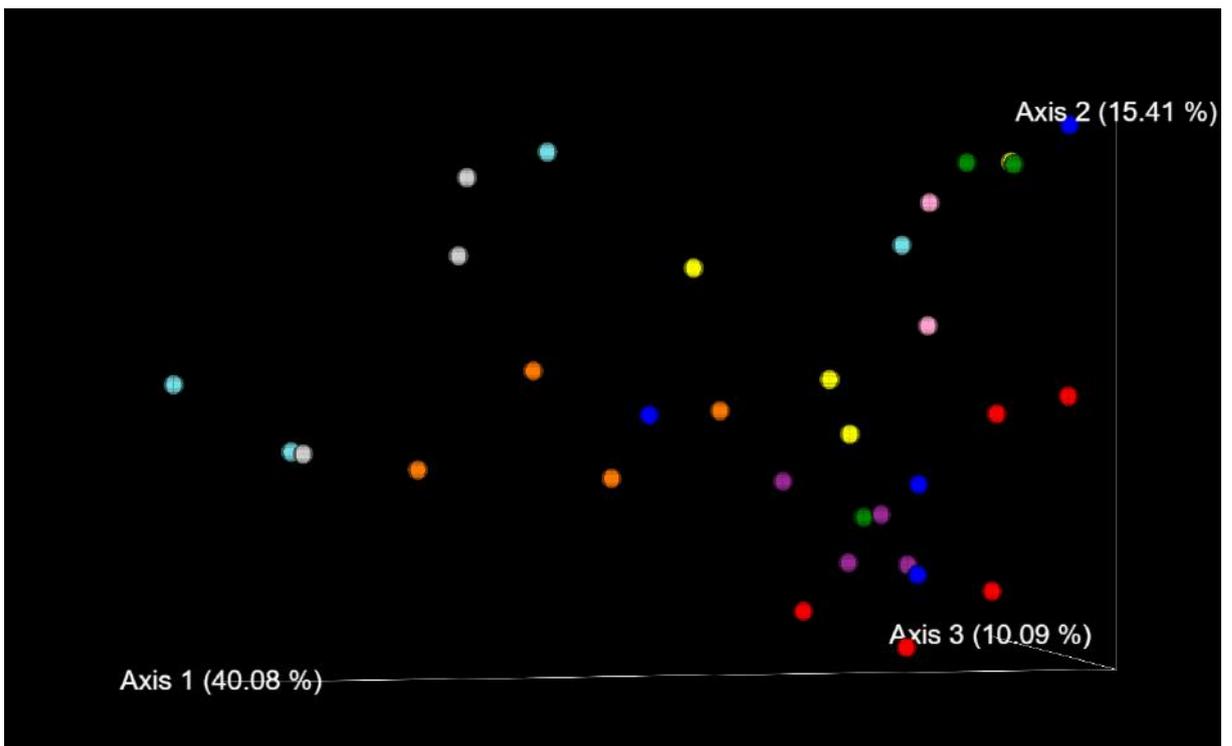
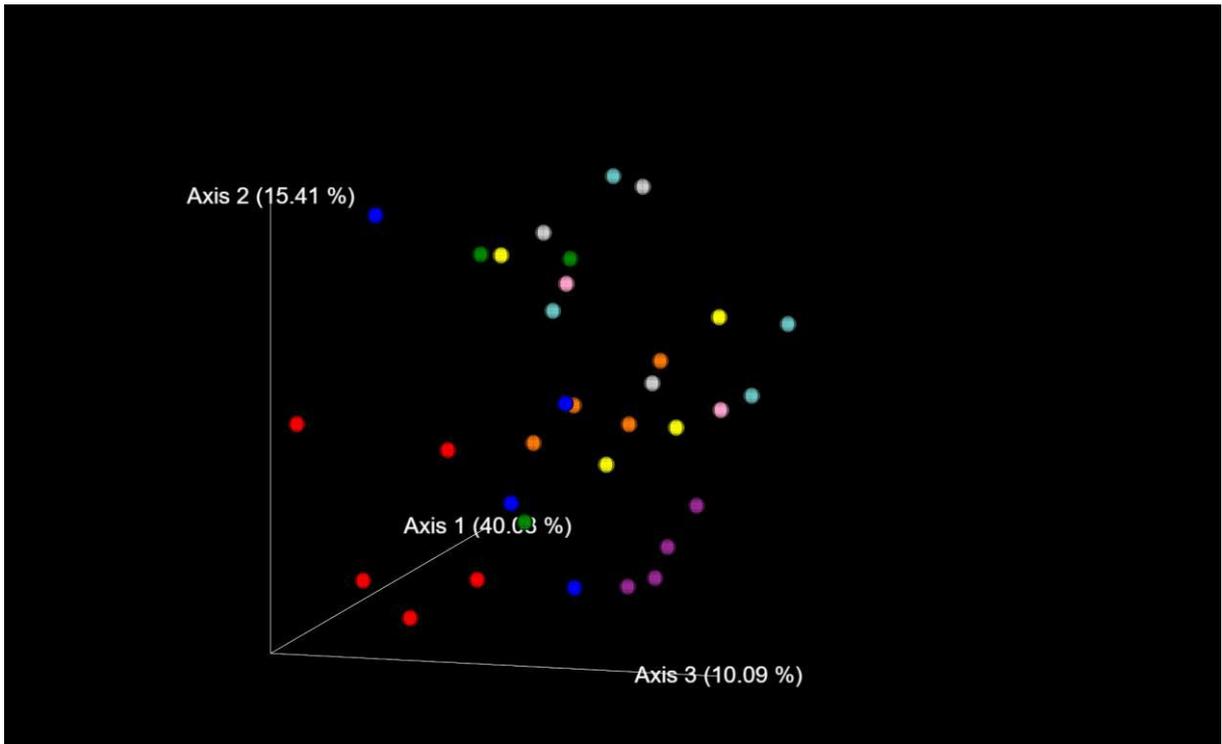


Figura 7- Análise de Coordenadas Principais (PCoA) estimada com base na métrica do weighted Unifrac. Ambas as figuras mostram mesmo gráfico 3D tendo como diferença apenas a rotação capturada. A terceira parte da figura relaciona cada amostra com sua cor representada no gráfico.

Tabela 6- Teste de PERMANOVA baseado nos resultados de beta-diversidade obtidos com o uso da métrica weighted-Unifrac. A comparação é feita entre o grupo 1 da tabela com a linha referente ao grupo 2.

Group 1	Group 2	p-value	q-value	
A	A_AE1	0,071	0,11	
	A_AE2	0,005	84	
	C_A1	0,088	0,11	
	C_A2	0,013	84	
	C_AE1	0,007	84	
	C_AE2	0,011	84	
	C_AES1	0,053	108	
	C_AES2	0,014	84	
A_AE1	A_AE2	0,056	108	
	C_A1	0,587	587	
	C_A2	0,029	0,09	
	C_AE1	0,457	0,51	
	C_AE2	0,06	108	
	C_AES1	0,272	0,31	
	C_AES2	0,052	108	
	A_AE2	C_A1	0,039	0,10
C_A2		0,021	84	
C_AE1		0,019	84	
C_AE2		0,15	0,18	
C_AES1		0,064	108	
C_AES2		0,066	108	
C_A1		C_A2	0,02	84
		C_AE1	0,512	0,52
	C_AE2	0,085	0,11	
	C_AES1	0,487	0,52	
	C_AES2	0,088	0,11	
C_A2	C_AE1	0,021	84	
	C_AE2	0,033	0,09	
	C_AES1	0,061	108	
	C_AES2	0,024	0,08	
C_AE1	C_AE2	0,062	108	
	C_AES1	0,511	0,52	
	C_AES2	0,032	0,09	
C_AE2	C_AES1	0,136	0,17	

	C_AES2	0,2	0,24
C_AES1	C_AES2	0,078	117

6. Discussão

Segundo especialistas em Biologia da Conservação, o impacto das ações antrópicas pode levar à sexta extinção em massa de biodiversidade (Braga, 2018). Por exemplo, em relação aos microrganismos, alterações de temperatura e na oferta de nutrientes podem afetar as comunidades microbianas (Cullen, 1991; Kirchman *et al.*, 1995; Morris *et al.*, 2005; Fuhrman *et al.*, 2006; Fuhrman, 2009; Gilbert *et al.*, 2009). Entretanto, o efeito das alterações nas comunidades microbianas em relação às condições ambientais ainda é parcialmente desconhecido. (Whitman *et al.*, 1998; Debashish *et al.*, 2005; Lauro *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011; Emiliani *et al.*, 2018).

Uma das grandes preocupações contemporâneas é a influência antrópica nas características ambientais. A atividade humana é o maior causador de modificações das condições ambientais, sendo o período geológico (Antropoceno) atual marcado pelas influências do comportamento humano no meio ambiente. Nesse sentido, um dos ambientes mais vulneráveis às ações antrópicas é o ambiente marinho. Por exemplo, a exploração de petróleo é uma atividade que constantemente causa contaminação de ambientes marinhos através do derrame de hidrocarbonetos do petróleo. Como já conhecido, a contaminação com hidrocarbonetos do petróleo em ambientes marinhos causa modificações na estrutura da comunidade microbiana, pois os hidrocarbonetos são tóxicos para muitas células microbianas. Por outro lado, um grupo limitado de microrganismos possuem a capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo e são favorecidos pela contaminação ambiental. O resultado da contaminação seria, então, a perda de diversidade microbiana. Entretanto, ainda pouco é estudado se o efeito de alterações das condições ambientais leva uma perda irreversível na diversidade microbiana ou se essa diversidade pode ser restabelecida com o aporte de diversidade microbiana suplementar (Thaler, 2021). Sendo assim, para tentar responder essas perguntas, os objetivos traçados com o nosso trabalho foram: (i) avaliar se a regeneração de um ambiente marinho previamente contaminado com hidrocarbonetos do petróleo resultará na regeneração da diversidade microbiana; (ii) determinar se um ambiente exógeno pode servir como banco de diversidade microbiana para recolonização de um ambiente impactado; e (iii) avaliar se a perda de diversidade microbiana é irreparável (extinção).

Primeiramente, para atingir esse objetivo foram montados diferentes biorreatores. Esses biorreatores foram montados com água marinha (A) ou com água marinha previamente contaminada com hexadecano (C). A nossa primeira hipótese é que a contaminação com hexadecano provoque alterações na estrutura da comunidade microbiana, incluindo a diminuição da diversidade microbiana. Para avaliar se a regeneração de um ambiente contaminado leva a regeneração da comunidade microbiana original presente na água marinha, outras 3 hipóteses foram estabelecidas: (i) comunidade microbiana se regenera naturalmente sem a necessidade de suplementação de diversidade microbiana; (ii) a suplementação de diversidade microbiana natural da água marinha regenera a comunidade microbiana; e (iii) uma comunidade microbiana exógena pode servir de banco de diversidade para regenerar a comunidade microbiana presente na água marinha. Para avaliar essas três hipóteses, os biorreatores que receberam a amostra previamente contaminada com hexadecano foram submetidos a 3 situações diferentes: (i) alimentação com água marinha estéril (sem suplementação microbiana) (C_AE); (ii) alimentação com água marinha (suplementação com comunidade microbiana marinha) (C_A); e (iii) alimentação com água marinha estéril e adição de comunidade microbiana exógena (comunidade microbiana de solo) (C_AES). Para comparação do padrão de regeneração da comunidade microbiana, foram utilizados dois controles: (i) água marinha (A) e (ii) biorreator montado com água marinha suplementado com água marinha estéril. Por fim, a comunidade microbiana presente em cada biorreator foi analisada através de sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S.

Primeiramente, foram analisados os índices de alfa diversidade da comunidade microbiana presente em cada biorreator. Para essa finalidade, foram utilizados os índices de Shannon e o índice de diversidade filogenética de Faith-PD. O resultado da análise do índice de Shannon e de Faith-PD indicou que a contaminação da água marinha com hexadecano não levou a uma diminuição da diversidade microbiana nas amostras contaminadas. Embora esse resultado não seja esperado, resultado semelhante também foi observado por Novello (2019) com água marinha contaminada com óleo cru. Da mesma maneira, não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores dos índices de Shannon e de Faith-PD obtidos nas amostras A, A_AE1, C_AE1, C_A1 e C_AES1. Entretanto, os resultados do índice de Shannon mostraram que a diversidade microbiana presente nas amostras A_AE2, C_AE2, e C_AES2 (que representam o período final desses biorreatores) foram menores do que a diversidade observada na amostra A. Esses resultados podem sugerir que, no nosso estudo, (i) a contaminação com hidrocarbonetos do petróleo não diminuiu a diversidade microbiana

(Shannon) e a diversidade filogenética (Faith-PD) da comunidade microbiana presente nas amostras de água marinha; ou (ii) a regeneração da diversidade microbiana ocorreu anteriormente a construção dos biorreatores (durante a fase dos pré-biorreatores). Para as duas hipóteses anteriores terem menor chance de ocorrerem poderia ser adicionado mais contaminante no pré-biorreator, tendendo a um maior impacto, e também haver uma avaliação das águas dos dois pré-biorreatores após os 7 dias que foram utilizados.

Adicionalmente, o nosso projeto avaliou o efeito da suplementação de comunidades microbianas, através da dispersão, na regeneração da diversidade alfa de cada ambiente. Teoricamente, a capacidade de populações microbianas alcançarem novos locais além do seu ponto de origem é o que permite a colonização de novas áreas geográficas (Ramette e Tiedje, 2007). Os nossos resultados mostraram que a suplementação de comunidades microbianas é essencial para a manutenção da diversidade microbiana. Entretanto, a origem da comunidade microbiana adicionada no sistema influencia na manutenção ou não da alfa diversidade. Por exemplo, como observado no biorreator A_AE, que foi suplementado com água marinha estéril, a comunidade microbiana presente na água marinha perde diversidade caso não sejam adicionadas constantemente células microbianas (em outras palavras, a diversidade microbiana marinha não se sustenta sem a adição constante de microrganismos). Essa hipótese é sustentada pelo resultado obtido no biorreator C_A (que foi alimentado com células microbianas marinhas) e mostrou que a alfa diversidade filogenética microbiana (Faith-PD) e o índice de Shannon foram maiores no período final do biorreator (C_A2) do que no período inicial (C_A1).

Por outro lado, a adição da comunidade microbiana de solo na amostra C_AES não levou ao aumento da alfa diversidade nas amostras C_AES2. Tanto o índice de Shannon, como o índice de Faith-PD foram menores em C_AES2 do que em C_AES1. Nesse caso, não é possível afirmar que a comunidade microbiana presente em uma amostra exógena (solo) possa servir como banco de diversidade microbiana para regeneração de ambientes marinhos impactados. Alguns fatores podem explicar o porquê a adição da comunidade microbiana exógena não levou ao aumento da diversidade microbiana em C_AES2: (i) presença majoritária de microrganismos não adaptados às condições da água marinha; ou (ii) competição por nicho com grupos microbianos já estabelecidos no biorreator C_AES.

Segundo Thaler (2021), a ecologia microbiana ainda se encontra com falta de compreensão básica de conceitos, como a própria diversidade e seu alcance microbiológico, e, por isso, tem sido muito comparada com a ecologia de macroorganismos. Porém, não se pode apropriar conceitos dessa maneira, visto que as dinâmicas de ecologia microbiana são bastante

divergentes. Por exemplo, embora nossos resultados de alfa-diversidade tenham mostrado que a contaminação com hidrocarbonetos não tenha alterado a diversidade microbiana, isso não quer dizer que a comunidade microbiana se manteve estável. Para responder essas perguntas, a composição e a estrutura da comunidade microbiana foram avaliadas através de análises de beta diversidade considerando as métricas do unweighted e weighted Unifrac, respectivamente.

Os resultados baseados na métrica unweighted-Unifrac mostraram que nas amostras contaminadas ou não que receberam apenas água marinha estéril (incluindo a que recebeu a comunidade microbiana do solo) composição da comunidade microbiana não foi estatisticamente diferente daquela encontrada na água marinha. Por outro lado, a amostra C_A2, que foi suplementada com microrganismos da água marinha, apresentou uma composição da comunidade microbiana diferente da apresentada na água marinha. Não podemos afirmar, no entanto, que essa mudança na composição da comunidade microbiana observada em C_A2 foi causada apenas pela contaminação prévia da água marinha desse biorreator, ou se pelo conjunto da contaminação mais o aporte de microrganismos presentes na água marinha. Como mencionado anteriormente, tanto a dispersão de microrganismos, como a contaminação ambiental podem alterar a composição da comunidade microbiana (Ramette e Tiedje, 2007; Gilbert *et al.*, 2009). De fato, no nosso caso de estudo, a regeneração do ambiente C_A, mesmo com aportes de microrganismos, não regenerou a comunidade microbiana naturalmente encontrada em ambientes marinhos.

Por outro lado, quando foi analisada a estrutura da comunidade microbiana com base na métrica weighted-Unifrac, o resultado mostrou que apenas os biorreatores C_A1 e A_AE1 apresentaram estrutura da comunidade microbiana semelhante às da água marinha (A). Em todos os outros casos, os tratamentos dos diferentes biorreatores alteraram a estrutura da comunidade microbiana. A diferença observada entre os resultados obtidos com as métricas unweighted e weighted- Unifrac podem ser resultado da reformulação da comunidade microbiana. Por exemplo, embora a métrica unweighted-Unifrac tenha mostrado que a composição da comunidade microbiana presente em C_A, A_AE, C_AE e C_AES tenha sido igual a presente em A, a métrica do weighted-Unifrac mostrou que a proporção de cada grupo microbiano possa ter alterado de acordo com o tratamento dos biorreatores.

Para uma tentativa mais fiel de representação da água marinha algumas medidas poderiam ser tomadas, como por exemplo a climatização dos biorreatores ou um controle de iluminação recebido pelas amostras. O trabalho almejava ter sido feito em triplicata (ou seja, 3 vezes) e por um período maior de tempo, o que nos traria uma maior base de dados e uma maior

confiança nos resultados. Porém devido a pandemia e suas implicações, não foi possível estender o trabalho até onde era planejado.

7. Conclusão

Com nossos resultados analisando todas as amostras, vimos na alfa diversidade que, no nosso estudo, (i) a contaminação com hidrocarbonetos do petróleo não diminuiu a diversidade microbiana (Shannon) e a diversidade filogenética (Faith-PD) da comunidade microbiana presente nas amostras de água marinha; ou (ii) a regeneração da diversidade microbiana ocorreu anteriormente a construção dos biorreatores (durante a fase dos pré-biorreatores). Ademais, tanto o índice de Shannon, como o índice de Faith-PD foram menores no período final da amostra que recebeu solo do que no período inicial. Nesse caso, não é possível afirmar que a comunidade microbiana presente em uma amostra exógena (solo) possa servir como banco de diversidade microbiana para regeneração de ambientes marinhos impactados

Avaliando os resultados da beta diversidade, observamos que a composição microbiana ficou similar entre as amostras (unweighted Unifrac), mas ao considerar a abundância dos grupos microbianos foi possível ver que a variação por conta dos diferentes tratamentos. Também foi observado em nosso caso de estudo, que a regeneração do ambiente que foi adicionado de água marinha, mesmo com aportes de microrganismos, não regenerou a comunidade microbiana naturalmente encontrada em ambientes marinho.

Por fim, compreendemos que o experimento realizado não pode responder com certeza todas as perguntas dos nossos objetivos, porém os resultados mostraram um passo a mais para entender como ocorre a sucessão microbiana em ambientes marinhos. Portanto, é necessário que se continue gerando estudos nessa área que é fundamental para melhor entender os resultados do impacto humano em nosso planeta.

8. Referências Bibliográficas

Andreoli, C. V., Andreoli, F. D. N., Piccinini, C., & Sanches, A. D. L. (2014). Biodiversidade: a importância da preservação ambiental para a manutenção da riqueza e equilíbrio dos ecossistemas. *ANDREOLI, CV; TORRES, PL Complexidade: redes e conexões do ser sustentável. 1ed. Curitiba: SENAR/PR, 443-464.*

Azevedo, F. D. A., & Farjalla, V. F. (2010). BIOGEOGRAFIA DE MICRORGANISMOS: PADRÕES, DIFICULDADES E PERSPECTIVAS. *Oecologia Australis, 14(4), 839-852.*

Braga, D. D. A. R. (2018). A “SEXTA EXTINÇÃO” E SUAS RELAÇÕES COM O CONCEITO DE BIODIVERSIDADE: UMA ANÁLISE HISTÓRICA. *Dia-Logos: Revista dos Alunos de Pós-Graduação em História, 12(2).*

- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852-857.
- Cavanaugh, C. M. (1994). Microbial Symbiosis: Patterns of Diversity in the Marine Environment. *American Zoologist*, 34(1), 79–89. doi:10.1093/icb/34.1.79
- Cerqueda-García, D., García-Maldonado, J. Q., Aguirre-Macedo, L., & García-Cruz, U. (2019). A succession of marine bacterial communities in batch reactor experiments during the degradation of five different petroleum types. *Marine Pollution Bulletin*, 110775. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.110775
- Cassemiro, F. A., & Padial, A. A. (2008). Teoria neutra da biodiversidade e biogeografia: Aspectos teóricos, impactos na literatura e perspectivas. *Oecologia brasiliensis*, 12(4), 9.
- Cullen, John J., (1991), Hypotheses to explain high-nutrient conditions in the open sea, *Limnology and Oceanography*, 36, doi: 10.4319/lo.1991.36.8.1578.
- da Costa Silva, R. W., de Paula, B. L. (2009). Causa do aquecimento global: antropogênica versus natural. *Terræ Didática*, 5(1), 42-49.
- Darwin, C. (1859). *The Origin of Species by Means of Natural Selection, Or The Preservation of Favored Races in the Struggle for Life*. Humboldt Publishing Company.
- Kirchman, D. L., Rich, J. H., & Barber, R. T. (1995). Biomass and biomass production of heterotrophic bacteria along 140 W in the equatorial Pacific: effect of temperature on the microbial loop. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 42(2-3), 603-619.
- Debashish, G., Malay, S., Barindra, S., & Joydeep, M. (2005). Marine Enzymes. *Marine Biotechnology I*, 189–218. doi:10.1007/b135785
- Dickey, J., Swenie, R., Turner, S., Winfrey, C., Yaffar, D., Padukone, A., ... & Kivlin, S. (2020). Do microorganisms obey macroecological rules?. *Authorea Preprints*.
- Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I., & Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *science*, 326(5960), 1694-1697.
- Emiliani, A. V. V., De La Hoz, M. Q., Vergara, E. Y. J., García, L. M. B., & León, J. G. (2018). Microorganismos marinos extremófilos con potencial en bioprospección. *Revista de la Facultad de Ciencias*, 7(2), 9-43.
- Ewers, R. M., & Didham, R. K. (2005). *Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation*. *Biological Reviews*, 81(01), 117. doi:10.1017/s1464793105006949
- Muller-Karger, F. E., Miloslavich, P., Bax, N. J., Simmons, S., Costello, M. J., Sousa Pinto, I., ... & Geller, G. (2018). Advancing marine biological observations and data requirements of the complementary essential ocean variables (EOVs) and essential biodiversity variables (EBVs) frameworks. *Frontiers in Marine Science*, 5, 211.
- Fuhrman, J. A. (2009). Microbial community structure and its functional implications. *Nature*, 459(7244), 193–199. doi:10.1038/nature08058
- Gilbert, J.A., Field, D., Swift, P., Newbold, L., Oliver, A., Smyth, T., Somerfield, P.J., Huse, S. and Joint, I. (2009), The seasonal structure of microbial communities in the Western English Channel. *Environmental Microbiology*, 11: 3132-3139
- Gilbert JA, Neufeld JD (2014) Life in a World without Microbes. *PLoS Biol* 12(12): e1002020. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002020>
- Gilbert, J. A., Steele, J. A., Caporaso, J. G., Steinbrück, L., Reeder, J., Temperton, B., ... & Field, D. (2012). Defining seasonal marine microbial community dynamics. *The ISME journal*, 6(2), 298-308.

ICMBio (2013) Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade .Aplicação de Critérios e Categorias da UICN na Avaliação da Fauna Brasileira versão 2.0
https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/especies_ameacadas/publicacoes/2013_apostila_aplicacao_critérios_categorias_UICN_versão_2.0.pdf

Fuhrman, J. A., Hewson, I., Schwalbach, M. S., Steele, J. A., Brown, M. V., & Naeem, S. (2006). Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 13104-13109.

Lauro, F. M., McDougald, D., Thomas, T., Williams, T. J., Egan, S., Rice, S., ... Cavicchioli, R. (2009). *The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(37), 15527–15533. doi:10.1073/pnas.0903507106

Leão, Z. M. A. N., Kikuchi, R. K. P. D., & Oliveira, M. D. D. M. D. (2008). Branqueamento de corais nos recifes da Bahia e sua relação com eventos de anomalias térmicas nas águas superficiais do oceano. *Biota Neotropica*, 8, 69-82.

Martiny, J. B. H., Bohannan, B. J., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., ... & Staley, J. T. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2), 102-112.

Morris, Robert M., Vergin, Kevin L., Cho, Jang-Cheon, Rappé, Michael S., Carlson, Craig A., Giovannoni, Stephen J., (2005), Temporal and spatial response of bacterioplankton lineages to annual convective overturn at the Bermuda Atlantic Time-series Study site, *Limnology and Oceanography*, 5, doi: 10.4319/lo.2005.50.5.1687.

Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 626-631.

Novello, B.; Cardoso, A. G. B ; Argentino, I. C. V. ; Seldin, L. ; Jurelevicius, D., (2019) Biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo em ambientes costeiros do rio de janeiro.

Peterson, C. H. (2003). *Long-Term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill*. *Science*, 302(5653), 2082–2086. doi:10.1126/science.1084282

Pena, Paulo Gilvane Lopes et al. Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão. SciELO, 31 de Jan. de 2020. Disponível em
<https://www.scielo.br/j/csp/a/RdpV54PDWjxktvSjhJRCvTP> > .Acesso em: 1 Set. 2021

Ramette, Alban & Tiedje, James. (2007). Biogeography: An Emerging Cornerstone for Understanding Prokaryotic Diversity, Ecology, and Evolution. *Microbial ecology*. 53. 197-207. 10.1007/s00248-005-5010-2.

Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S, et al. (2007) The *Sorcerer II* Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *PLOS Biology* 5(3): e77.

Silva, C. M.; Arbilla, G.* (2018). Antropoceno: Os Desafios de um Novo Mundo ,Rev. Virtual Quim., 2018, 10 47(6), 1619-1647

da Silva, D. D. C., Vieira, H. A. G., Rolim, V. S., da Silva, W. F., de Sousa, M. G., Paulino, M. G., & dos Santos Mariano, W. (2021). Contaminantes ambientais: efeitos dos microplásticos em organismos aquáticos e terrestres. *Research, Society and Development*, 10(7), e54310716761-e54310716761. Stern, Arthur C. *Air Pollution: The effects of air pollution*. Vol. 2. Elsevier, 1977.

Thaler, D. S. (2021). Is global microbial biodiversity increasing, decreasing, or staying the same?. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 202.

Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578-6583.

Zhang, Y., Arends, J. B. A., Van de Wiele, T., & Boon, N. (2011). *Bioreactor technology in marine microbiology: From design to future application*. *Biotechnology Advances*, 29(3), 312–321. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.