

Angela de Gouveia Bernardo Cardoso

DESENVOLVIMENTO DE BIOMARCADORES PARA
DETECÇÃO DA PRESENÇA DE HIDROCARBONETOS
EM AMBIENTES MARINHOS DO RIO DE JANEIRO



**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 realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Diogo de Azevedo Jurelevicius e coorientação de Bianca Novello.

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

B523d Cardoso, Angela de Gouveia Bernardo
 DESENVOLVIMENTO DE BIOMARCADORES PARA DETECÇÃO
DA PRESENÇA DE HIDROCARBONETOS EM AMBIENTES
MARINHOS DO RIO DE JANEIRO / Angela de Gouveia
Bernardo Cardoso. -- Rio de Janeiro, 2022.
 55 f.

 Orientador: Diogo de Azevedo Jurelevicius.
 Coorientador: Bianca Novello.

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

 1. Biomarcadores. 2. Degradação de óleo. 3.
Ambientes marinhos. 4. Biomonitoramento. 5.
Derramamentos de óleo. I. de Azevedo Jurelevicius,
Diogo, orient. II. Novello, Bianca, coorient. III.
Titulo.

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.

**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: **Angela de Gouveia Bernardo Cardoso**
DRE: 118092460

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Mateus Gomes de Godoy (Presidente)

Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida

M.Sc. Ericka Arregue de Lemos

Profa. Lucy Seldin (Suplente)

Título da Monografia: **“Desenvolvimento de biomarcadores para detecção da
presença de hidrocarbonetos em ambientes marinhos do Rio de Janeiro”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/ois-ptyh-fvy>

Data e hora de início: **09 de março de 2022 às 15:00h**

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 9,5 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, 09 de março de 2022.

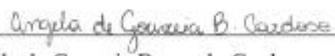
NOTA Banca Examinadora:

9,5 Prof. Mateus Gomes de Godoy
9,5 Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida
9,5 M.Sc. Ericka Arregue de Lemos
_____ Profa. Lucy Seldin

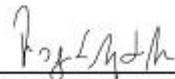
Presidente da banca


Prof. Mateus Gomes de Godoy

Aluno:


Angela de Gouveia Bernardo Cardoso

Orientador:


Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius / Coorientador: Bianca Novello

Coordenador
de TCC


Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

*Dedico este trabalho à minha família, por todo
o amor e o incentivo durante toda a minha
jornada de Graduação.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter tido essa oportunidade incrível de poder seguir meus sonhos e consegui chegar até o fim de mais uma etapa.

Aos meus pais, Rosângela e Marcelo por sempre estarem do meu lado e me apoiarem em todos os momentos mais difíceis da minha vida, sou muito grata e amo muito vocês. Assim como minha irmã Lívia que sempre me deu os melhores conselhos e sempre me apoiou em todas as minhas decisões, além de me salvar na hora de montar slides para as minhas apresentações.

As minhas amigas Manoela Costa e Barbara Mendes que estão do meu lado a anos e que sempre me deram todo o apoio possível nessa caminhada.

As minhas amigas do grupo Seleção Natural: Júlia, Evely, Isabella, Hellen, Giovanna, Natália, Andressa e Julia Motta que estão comigo desde os primeiros dias da graduação até o fim. Obrigada pelos momentos de risadas, abraços, conversas e por serem minha base e grande motivo para que eu seguisse em frente apesar de tudo.

Ao meu companheiro Lucas que está sempre do meu lado, me acalmando, acolhendo e me incentivando a dar sempre o meu melhor em tudo, amo você.

A toda a minha família que sempre acreditou em mim, especialmente á minha avó Fernanda que mesmo não estando aqui comigo nesse momento, tenho certeza do quão orgulhosa ela estaria de mim agora.

Gostaria também de agradecer ao meu orientador Diogo Jurelevicius por ser o melhor orientador de todos, pelas risadas, ensinamentos e por todo o suporte que me possibilitou chegar ao fim de desse projeto.

As minhas coorientadoras maravilhosas Bianca e Isabella por todo o ensinamento, paciência e ajuda nos momentos em que eu me desesperava ao realizar os experimentos. Assim como a Juliana e o Raphael por sempre me ajudarem e me darem suporte em todos os momentos.

Gostaria de agradecer muito a todo pessoal do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana, do Laboratório de Genética Microbiana por me receberem de forma tão carinhosa, pelas risadas, conversas e por sempre me ajudarem em todas as dificuldades durante essa caminhada.

Agradeço a todos os professores do curso de Microbiologia e Imunologia por todo o ensinamento passado e por serem fundamentais em minha formação profissional e pessoal.

Por fim, gostaria de agradecer a todos da banca por terem aceito o nosso convite, e ao CNPq e a PIBIC pela bolsa de estudos a mim concedida durante esta iniciação científica.

RESUMO

ANGELA DE GOUVEIA BERNARDO CARDOSO

DESENVOLVIMENTO DE BIOMARCADORES PARA DETECÇÃO DA PRESENÇA DE HIDROCARBONETOS EM AMBIENTES MARINHOS DO RIO DE JANEIRO

Orientador: Diogo de Azevedo 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.

Derramamentos de petróleo provocam enormes danos a ambientes marinhos, pois os hidrocarbonetos que o compõem são tóxicos para a maioria dos seres vivos. Em ambientes contaminados há um enriquecimento de bactérias que possuem a capacidade de utilizar hidrocarbonetos do petróleo como fonte de carbono e energia para o seu crescimento. Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos podem ser promissoras biomarcadores de contaminação por petróleo em ambientes marinhos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho consiste em identificar um grupo de bactérias que sirvam como ferramenta de biomonitoramento de ambientes marinhos contaminados com hidrocarbonetos do petróleo. Para isto, ao longo de 5 meses, foram coletadas semanalmente amostras de água de diferentes praias do Rio de Janeiro, Brasil. Amostras de água marinha sem contaminação com hidrocarbonetos foram utilizadas como controle da comunidade microbiana marinha. Para avaliar o efeito da contaminação na comunidade microbiana, cada uma dessas amostras foi, inicialmente, distribuída em 3 tubos falcon (30 ml de água marinha), contaminada com 30 µl de hexadecano e mantida sob agitação por 7 dias em temperatura ambiente (próxima a temperatura do mar no momento da coleta). Ao final de 7 dias, todas as amostras foram filtradas em membranas Millipore de 0,22 µm, e as membranas contendo as células microbianas foram utilizadas para extração do DNA da comunidade bacteriana. A comunidade microbiana foi, então, analisada por métodos independentes de cultivo (PCR-DGGE e sequenciamento de DNA) com base no gene que codifica o rRNA 16S. Os resultados preliminares obtidos pela análise de PCR-DGGE mostraram que os perfis das comunidades bacterianas presentes nas diferentes amostras analisadas são diversos e variam de acordo com as coletas. Pode-se identificar também, bandas que aparecem em todas as amostras. A identificação desses grupos que estão presentes em todas as amostras contaminadas poderá ser utilizada como indicativo de biomarcador ambiental. Na análise baseada em sequenciamento de DNA, foi obtido um total de 3.079.150 seqüências do gene que codifica o rRNA 16S. Os resultados mostraram que a alfa diversidade microbiana (baseado nos índices de Shannon e de Faith-PD) foi maior nas amostras contaminadas com hexadecano do que nos controles não contaminados (considerando $p=0,05$). A análise de beta-diversidade baseada nas métricas unweighted e weighted Unifrac mostrou que a estrutura e composição da comunidade microbiana é diferente nas amostras contaminadas e não contaminadas com hidrocarbonetos. A análise dos grupos taxonômicos presentes nas amostras contaminadas identificou possíveis 5 gêneros bacterianos que podem ser promissoras biomarcadores da presença de hidrocarbonetos em ambientes marinhos. Adicionalmente, neste estudo, foi realizado o isolamento bacteriano em meio Marine Broth (MB). A capacidade das bactérias isoladas de degradar hidrocarbonetos do petróleo foi avaliada em testes de degradação em placa de 24 poços, utilizando meio BH enriquecido com hexadecano como única fonte de carbono. No total foram isoladas 87 estirpes bacterianas, incluindo 29 estirpes bacterianas do mês 1, 34 do mês 3 e 24 isolados do mês 5. Deste total, foram isoladas 24 estirpes bacterianas degradadoras de hexadecano do mês 1, 20 do mês 3 e 10 do mês 5. Como resultados do

sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S, foi obtido um total de 3079150 sequências, onde foram feitas análises de alfa e beta diversidade. Os resultados obtidos através desse estudo poderão ser utilizados como ferramentas de biomonitoramento de ambientes marinhos.

Palavras chave: Biomarcadores; Ambientes marinhos; Degradação de óleo; Biomonitoramento.

ABSTRACT

ANGELA DE GOUVEIA BERNARDO CARDOSO

DEVELOPMENT OF BIOMARKERS FOR DETECTION OF THE PRESENCE OF HYDROCARBONS IN MARINE ENVIRONMENTS OF RIO DE JANEIRO

Orientador: Diogo de Azevedo 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.

Oil spills cause enormous damage to marine environments, as petroleum hydrocarbons are toxic to most living beings. In contaminated environments there is an enrichment of bacteria that have the ability to use petroleum hydrocarbons as a source of carbon and energy for their growth. Hydrocarbon-degrading bacteria may be promising oil-for-oil biomarkers in marine environments. Therefore, the objective of this work is to identify a group of bacteria that serves as a biomonitoring tool in marine environments contaminated with petroleum hydrocarbons. For this, over 5 months, weekly water samples were collected from different beaches in Rio de Janeiro, Brazil. Marine water samples without hydrocarbons were used to control the marine microbial community. To evaluate the effect of nature on nature, each one of their community initially distributed in 3 tubes Falcon (30 ml of seawater), contaminated with 30 μ l of hexadecane and kept under agitation for 7 days at room temperature (close to sea temperature at the time of collection). At the end of 7 days, all samples were filtered through 0.22 μ m Millipore membranes, and the membranes containing the microbial cells were used to extract DNA from the bacterial community. The microbial community was then analyzed by culture-independent methods (PCR-DGGE and DNA sequencing) based on the gene encoding 16S rRNA. The results obtained by the PCR-DGGE analysis showed that the profiles of the bacterial communities present in the different samples analyzed are diverse and vary according to the collections. We can also verify bands that appear in all samples. The identification of these groups that are present in all contaminated samples can be used as an environmental biomarker. In the analysis based on DNA sequencing, a total of 3079150 sequences of the gene encoding 16S rRNA were obtained. The results showed that alpha microbial diversity (based on Shannon and Faith-PD indices) was higher in samples contaminated with hexadecane than in uncontaminated controls (assuming $p=0.05$). Beta-diversity analysis based on Unifrac unweighted and weighted metrics showed that the structure and composition of the microbial community is different in samples contaminated and not contaminated with hydrocarbons. The analysis of the taxonomic groups present in the contaminated samples identified possible 5 bacterial genera that could be promising biomarkers of the presence of hydrocarbons in marine environments. Additionally, in this study, bacterial isolation was performed in Marine Broth (MB) medium. The ability of the isolated bacteria to degrade petroleum hydrocarbons was evaluated in 24-well plate degradation tests using hexadecane-enriched BH medium as the sole carbon source. In total, 87 bacterial strains were isolated, including 29 bacterial strains from month 1, 34 from month 3 and 24 strains from month 5. Of this total, 24 bacterial strains degrading hexadecane from month 1, 20 of month 3 and 10 of month were isolated. 5. As a

result of the sequencing of the gene encoding 16S rRNA, a total of 3079150 sequences were obtained, where alpha and beta diversity analyzes were performed. The results obtained through this study can be used as tools for biomonitoring of marine environments.

Keywords: Biomarkers; Marine environments; Oil degradation; Biomonitoring.

RESUMO PARA LEIGOS

ANGELA DE GOUVEIA BERNARDO CARDOSO

DESENVOLVIMENTO DE BIOMARCADORES PARA DETECÇÃO DA PRESENÇA DE HIDROCARBONETOS EM AMBIENTES MARINHOS DO RIO DE JANEIRO

Orientador: Diogo de Azevedo Jurelevicius

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

Grandes acidentes ambientais por derramamento de óleo podem ser gerados pela ação de indústrias petrolíferas. Esses derramamentos provocam enormes danos a ambientes marinhos, pois os hidrocarbonetos (compostos químicos que fazem parte do petróleo bruto), são tóxicos para a maioria dos seres vivos. Entretanto, nesses ambientes contaminados há um aumento no número de bactérias que possuem a capacidade de “se alimentar” esses hidrocarbonetos do petróleo como fonte de energia para o seu crescimento. Essas bactérias degradadoras de hidrocarbonetos podem ser promissoras biomarcadores, um grupo de bactérias capazes de detectar a contaminação por petróleo nesses ambientes marinhos. Os biomarcadores detectam de forma precoce e precisa os efeitos reais que estão ocorrendo aos seres vivos que habitam esses ambientes contaminados. Sendo assim, o objetivo deste trabalho consiste em identificar um grupo de bactérias que sirvam como ferramenta de biomonitoramento de ambientes marinhos contaminados com hidrocarbonetos do petróleo. Para isto, ao longo de 5 meses, foram coletadas semanalmente amostras de água de diferentes praias do Rio de Janeiro, Brasil. Com o intuito de simular a contaminação desses locais, todas as amostras foram, inicialmente, distribuídas em 3 tubos (30ml de água marinha), contaminadas propositalmente e mantidas sob agitação por 7 dias em temperatura ambiente. Como nem todas as bactérias podem ser cultivadas em laboratório, todas as amostras foram, posteriormente a contaminação, submetidas a filtração em membranas que retêm as células para subsequente extração do DNA da comunidade bacteriana, que foi posteriormente analisado. Adicionalmente foi realizado o isolamento das bactérias capazes de serem cultivadas, onde as mesmas crescem em placas contendo o meio de cultura Marine Broth (MB). A capacidade das bactérias isoladas de degradar hidrocarbonetos do petróleo foi avaliada em testes de degradação em placa de 24 poços, utilizando meio BH (um meio de cultura que não possui nenhuma fonte de carbono), enriquecido com hexadecano. Os resultados preliminares obtidos pela análise molecular mostraram que os perfis das comunidades bacterianas presentes nas diferentes amostras analisadas são diversos e variam de acordo com a data das coletas. Pode-se verificar também, grupos bacterianos que aparecem em todas as amostras. A identificação desses grupos que estão presentes em todas as amostras contaminadas poderá ser utilizada como indicativo de biomarcador ambiental. No total foram isoladas 87 bactérias, incluindo 29 do mês 1, 34 do mês 3 e 24 isolados do mês 5. Deste total, foram isoladas 24 bactérias degradadoras de petróleo do mês 1, 20 do mês 3 e 10 do mês 5. Como resultados do sequenciamento genético, foi obtido um total de 3.079.150 seqüências, onde foram feitas análises de diversidade. Os resultados obtidos através desse estudo poderão ser utilizados como ferramentas de biomonitoramento de ambientes marinhos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Composição do petróleo com seus 4 grupos principais.....
- Figura 2:** Mapa ilustrativo do Rio de Janeiro mostrando os diferentes pontos de coleta utilizados.....
- Figura 3:** Análise da comunidade microbiana presente nas amostras por DGGE.....
- Figura 4:** Análise de alfa-diversidade das ASVs presentes nas amostras, (A) levando em consideração a comparação entre amostras não contaminadas e contaminadas (B) levando em consideração a comparação entre as amostras mensais e o controle positivo.....
- Figura 5 -** Gráfico boxplot da distribuição dos valores de estimativa da alfa diversidade (A) entre as amostras mensais (B) entre as amostras contaminadas e não contaminadas (índice de Shannon)
- Figura 6:** Gráfico boxplot acima demonstra a variação de alfa diversidade a partir da análise por grupos filogenéticos através da análise por Faith-PD para as diferentes amostras contaminadas (A) e em comparação de amostras não contaminadas com as contaminadas com hidrocarbonetos (B).....
- Figura 7:** Análise de PCoA das amostras estudadas baseado na métrica *Weighted* Unifrac. As amostras se apresentam coloridas de acordo com (A) a separação entre amostras contaminadas e não contaminadas e (B) entre as amostras dos diferentes meses em relação a amostras sem contaminação.....
- Figura 8.** Análise de PCoA das amostras estudadas baseado na métrica *Unweighted* Unifrac. As amostras se apresentam coloridas (A) levando em consideração a comparação entre amostras contaminadas e não contaminadas (B) levando em consideração a comparação entre as amostras mensais e o controle positivo.....
- Figura 9.** Gráfico de abundância relativa dos gêneros observados nas diferentes amostras. (A) Panorama geral da distribuição dos diferentes gêneros observados e (B) seleção dos principais gêneros enriquecidos pela presença de hidrocarbonetos do petróleo.....
- Figura 10 :** Representação gráfica da quantidade de isolados obtidos das diferentes amostras e do total de isolados positivos para degradação de hidrocarbonetos.....

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Meio de cultura Marine Broth, descrição e a quantidade dos componentes.....	29
Quadro 2: Meio <i>Bushnell Haas</i> , descrição e a quantidade dos componentes.....	55
Quadro 3: Datas, locais, períodos e características físico-químicas das amostras mensais coletadas.....	44
Quadro 4: Análise estatística de Kruskal-Wallis baseado nos valores de distribuição de ASVs das amostras mensais e controle (A).....	77.
Quadro 5: Análise estatística de Kruskal-Wallis baseado no índice de Shannon das amostras mensais e controle (A).....	
Quadro 6: Análise estatística de Kruskal-Wallis baseado no índice de Faith-PD das amostras mensais e controle (A).....	

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ASV** – Variantes de sequências amplificadas (*amplicon sequence variant*)
- ANA** – Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico
- BH** – Meio mineral Bushnell Haas (Bushnell Haas)
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- Dntp** – Desoxirribonucleico fosfatados
- DBO** – Demanda Bioquímica de Oxigênio
- DGGE** – Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
- IQA** – Índice de Qualidade das Águas
- Kb** – Kilobase
- MB** – Caldo marinho (*Marine Broth*)
- PCR** – Reação de polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)
- rRNA** – Ácido ribonucleico ribossomal
- TAE** – Solução tampão Tris-Acetato-EDTA
- TEB** – Solução tampão Tris-Borato-EDTA

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
RESUMO PARA LEIGOS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE QUADROS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Petróleo e os impactos da contaminação ambiental.....	1
1.2 Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos.....	4
1.3 Monitoramento de hidrocarbonetos.....	5
1.4 Bioindicadores ambientais.....	6
2 JUSTIFICATIVA	8
3 OBJETIVOS	9
3.1 Objetivos específicos.....	9
4 MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 Área de estudo e amostragem.....	10
4.2 Determinação dos fatores abióticos.....	10
4.3 Enriquecimento de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos.....	11
4.4 Extração de DNA total das amostras.....	11
4.5 Análise molecular da comunidade microbiana presente nas amostras: PCR-DGGE:.....	12
4.6 Sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S.....	12
4.7 Isolamento de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos.....	13
4.8 Obtenção das células utilizadas para o teste de degradação de hidrocarbonetos...	13
4.9 Teste de degradação de hexadecano.....	14
5 RESULTADOS	
5.1 Locais, datas de coleta e características físico-químicas das amostras.....	15
5.2 Análise DGGE.....	15
5.3 Caracterização da comunidade bacteriana presente nas diferentes amostras.....	17
5.4 Análise da distribuição de variantes de sequências amplificadas (ASVs).....	18
5.5 Análise da diversidade da comunidade bacteriana: Índice de Shannon.....	20
5.6 Análise da alfa diversidade da comunidade bacteriana: Índices Faith-PD	22
5.7 Isolamento das estirpes bacterianas degradadoras de hidrocarbonetos.....	24
5.8 Identificação dos grupos bacterianos predominantes encontrados nos diferentes microcosmos.....	27
5.9 Isolamento das estirpes bacterianas degradadoras de hidrocarbonetos.....	
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÕES	30
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
	36

INTRODUÇÃO

1.1 Petróleo e os impactos da contaminação ambiental

O petróleo bruto é composto por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, apresentando quantidades variadas de enxofre, nitrogênio, oxigênio e metais. Sua composição exata varia consideravelmente em função do seu reservatório de origem (Mariano, 2001). Análises da composição química do petróleo por espectrometria de massas de alta resolução, identificaram mais de 17.000 componentes químicos diferentes. Apesar de sua complexidade, os compostos que constituem o petróleo bruto podem ser classificados em quatro grupos principais: hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos, resinas e asfaltenos (**Figura 1**) (Head *et al.*, 2006).

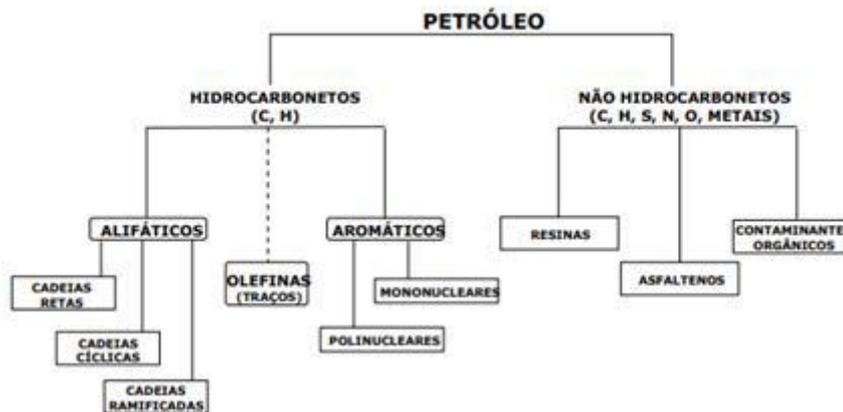


Figura 1: 4 Principais grupos que compõem o petróleo bruto.

Fonte: <http://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/1285870/313/Petroleo.pdf>

Pelo fato de o petróleo ser um dos principais recursos energéticos utilizados mundialmente, existe uma alta demanda para sua exploração. Por esse motivo, o volume de petróleo extraído é muito grande e isso acaba sendo um risco para o meio ambiente, uma vez que a contaminação por hidrocarbonetos do petróleo é a maior causadora da poluição de ambientes aquáticos e terrestres (Holliger *et al.*, 1997). Acidentes por vazamentos e derramamentos ocorrem regularmente desde a exploração, até a fase de armazenamento do mesmo. A contaminação do solo por hidrocarbonetos pode causar grandes impactos ecológicos negativos a sistemas terrestres e marinhos. A poluição no mar, por exemplo, pode ocorrer não apenas na superfície

marinha, mas também em águas mais profundas, levando a impactos ambientais ainda mais extensos (Keramea *et al.*, 2021).

Fatores como espalhamento, evaporação, dispersão/difusão, emulsificação e dissolução são importantes em estágios iniciais do derramamento de óleo, enquanto a foto-oxidação, biodegradação e sedimentação são fatores a longo prazo que determinam o destino final do óleo derramado. Muitos constituintes do petróleo bruto são recalcitrantes e altamente tóxicos, sendo os hidrocarbonetos um dos poluentes orgânicos mais persistentes. Devido à sua biomagnificação, esses componentes causam danos extensos e permanentes aos ecossistemas (Varjani, 2017).

No solo, os hidrocarbonetos de petróleo podem afetar suas propriedades tanto físicas (como textura, compactação, estado estrutural e resistência à penetração) quanto químicas (como concentração e conteúdo de minerais e metais). Já em ambientes aquáticos, esses contaminantes também possuem efeitos inibitórios sobre o crescimento das plantas, podendo reduzir a penetração da luz e diminuir a dissolução de oxigênio, perturbando a estabilidade dos ecossistemas subaquáticos ao alterar a fotossíntese de organismos autotróficos (Ossai *et al.*, 2019; Imron *et al.*, 2020). Além disso, a exposição aos componentes do petróleo bruto pode causar diversos problemas toxicológicos à saúde humana e de animais, incluindo hemotoxicidade, carcinogenicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, teratogenicidade, citotoxicidade, dentre outras. Em impactos a longo prazo em animais marinhos, alguns problemas como redução da mandíbula, falta de pigmentação e crânios não fundidos (Ossai *et al.*, 2019; Varjani, 2017).

Os derramamentos de petróleo também são prejudiciais do ponto de vista econômico e social. Além da perda imediata do valor do conteúdo derramado, há danos associados a falhas mecânicas dos navios, além dos custos diretos de limpeza e remediação do óleo que foi dispersado. As áreas costeiras são uma importante fonte de recursos econômicos, e derramamentos de óleo podem ter implicações desastrosas para a pesca e outras atividades locais, como o turismo. O atraso de medidas de remediação também permite o desenvolvimento de agregados mais persistentes e entrancheamentos nas costas, que são caros e difíceis de remover, além de implicações geomórficas de longo prazo para a hidrodinâmica do litoral (Zhang *et al.*, 2019)

Os derramamentos são categorizados de acordo com a quantidade de descarga de óleo e classificados em quatro principais tipos: derramamentos menores, derramamentos médios,

grandes derramamentos e desastres (Tewari e Sirvaiya, 2015). Diversos desastres por derramamentos ocorreram mundialmente (**Tabela 1**). Um dos mais recentes, que teve por resultado o derramamento de 200 milhões de toneladas de petróleo no mar, ocorreu no Golfo do México na plataforma Deepwater Horizon em 2010, sendo considerado um dos piores acidentes ambientais dos Estados Unidos da América. (Sousa *et al.*, 2014).

Tabela 1- Maiores derramamentos de óleo do mundo entre os anos de 1991 e 2019 (adaptado de Tewari e Sirvaiya, 2015).

Ano	Local	Pais	Derramamento de óleo (milhões de galões aprox).
1991	Golfo do Kuwait	Kuwait	240-337
1979	Baía de Campeche	México	140
1979	Trindade e Tobago	Índias Ocidentais	88.4
1992	Vale Fergana	Uzbequistão	87.8
1983	Nowruz	Golfo Persa	80
1991	ABT Summer	Angola	80
1983	Baía Saldanha	África do Sul	78.6
1978	Off Brittany	França	68.8
1988	Nova Escócia	Canadá	43.05
1991	Genova	Itália	42
2010	Deepwater Horizon	Golfo do México	200
2019	Litoral	Brasil	5

O Brasil é um dos maiores produtores de petróleo do mundo. Uma das formas de extração utilizadas é através de plataformas *offshore* que ficam localizadas na costa do estado do Rio de Janeiro. Como já relatado anteriormente, esse processo pode impactar severamente o ambiente litorâneo (Jurelevicius *et al.*, 2013). Um dos impactos mais recentes ocorreu de agosto a dezembro do ano de 2019. Nesse período, um derramamento massivo de toneladas de óleo cru, de origem ainda desconhecida atingiu 4.334 km do litoral brasileiro chegando a 11 estados do Nordeste e Sudeste. Tal desastre é considerado o pior derramamento de óleo da história do Brasil gerando danos incalculáveis ao ecossistema e à população local, e um das maiores já registrados mundialmente (Cerqueira *et al.*, 2020; Pena *et al.*, 2020).

1.2 Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos

Como os hidrocarbonetos ocorrem naturalmente em todos ambientes, diversos microrganismos, como bactérias, arqueias e fungos, desenvolveram a capacidade de utilização desses compostos como fontes de carbono e energia para seu crescimento (Atlas e Hazen, 2011). Dentre eles, as bactérias são as mais empregadas, sendo consideradas elemento principal em trabalhos que abrangem a biodegradação de contaminantes (Andrade, Augusto e Jardim, 2010).

Apesar de diversos contaminantes serem metabolizados por microrganismos, alguns são mais facilmente biodegradados do que outros. No caso dos hidrocarbonetos de petróleo, muitas áreas contaminadas, como citado anteriormente, possuem uma mistura complexa de hidrocarbonetos e compostos orgânicos. As taxas de biodegradação desses diversos compostos são diferentes e dependem de vários fatores como a composição do óleo e o estado e concentração do óleo e dos hidrocarbonetos. Além disso, a temperatura, concentrações de oxigênio e nutrientes, a salinidade e a pressão são variáveis ambientais importantes para o processo de biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo. Em sistemas aquáticos, taxas de aumento de dispersão e emulsificação também são considerados fatores importantes para biodegradação (Leahy e Colwell, 1990; Andrade, Augusto e Jardim, 2010). A importância desses fatores se dá pela presença de produtos microbianos biosurfactantes/bioemulsificantes que estimulam as taxas de dissolução ou solubilização, ou mesmo emulsificação de hidrocarbonetos, aumentando sua disponibilidade, e com isso, os microrganismos conseguem acessá-lo e metabolizá-lo (Perdigão, 2021).

Segundo Das e Chandran (citado por Peixoto, 2017) a degradação microbiana aos hidrocarbonetos se dá de acordo com sua susceptibilidade sendo, portanto, biodegradados na seguinte ordem: n-alcenos > alcenos ramificados > aromáticos de baixo peso molecular > cicloalcenos > aromáticos de alto peso molecular. Ainda assim, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de alto peso molecular (HPAs) podem não ser degradados e são considerados recalcitrantes.

As espécies capazes de degradar os hidrocarbonetos do petróleo estão entre as mais estudadas da microbiologia ambiental aplicada. No ano de 2011, mais de 200 gêneros de bactérias, fungos e algas abrangendo mais de 500 espécies já foram identificados com essa capacidade (Kostka *et al.*, 2011). Esses microrganismos são onipresentes, porém constituem apenas uma pequena proporção da comunidade microbiana de ambientes não contaminados, representando,

geralmente, cerca de menos de 1% do total da comunidade microbiana. Esses microrganismos degradadores de óleo são mais facilmente detectados em ambientes contaminados com hidrocarbonetos, onde se tornam parte da comunidade microbiana dominante do ambiente (Atlas, 1995; Atlas e Hazen, 2011).

Em geral, microrganismos pertencentes a um ambiente já poluído, podem levar a uma degradação mais eficaz do petróleo bruto, do que os microrganismos encontrados em um ambiente o qual há esse tipo de poluição. Esse fenômeno é provocado pelo enriquecimento seletivo desses microrganismos que utilizam hidrocarbonetos como fonte de carbono e pela amplificação e mutação do *pool* de genes que canalizam a degradação de hidrocarbonetos (Colwell, Walker e Cooney, 1977; Leahy e Colwell, 1990).

A biodegradação de hidrocarbonetos envolve uma série de etapas que englobam diferentes enzimas. Esses compostos podem ser metabolizados seletivamente por cepas individuais de microrganismo ou consórcio de cepas microbianas pertencentes ao mesmo ou a diferentes gêneros. Na maioria dos microrganismos, as enzimas para biodegradação são codificadas em plasmídeos. Vários plasmídeos estão envolvidos na degradação de hidrocarbonetos de petróleo, como Q15, OCT, TOL, NAH7, pND140 e pND160 com presença dos genes *alkA*, *alkM*, *alkB*, *theA*, *LadA*, *assA1*, *assA2* e *nahA*, e as principais enzimas envolvidas no processo são monoxigenases, dioxigenases e desidrogenases (Varjani, 2017; Imron, 2020).

1.3 Monitoramento de hidrocarbonetos

Para a caracterização da contaminação ambiental por hidrocarbonetos, diferentes técnicas podem ser empregadas e em diferentes níveis. Para levantamentos iniciais, podem ser utilizados métodos como quantificação de concentração total do óleo ou a determinação dos HPAs (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromático) totais, por técnicas de fluorescência. Os métodos existentes para análises mais detalhadas são baseados em cromatografia líquida com detecção de fluorescência (HPLC-FLD) ou gasosa com detecção por ionização de chama (CG/DIC) ou associada à espectrometria de massa (CG/EM) (Wagener *et al.*, 2012, Pang *et al.*, 2018).

Embora tenham suas vantagens e sejam métodos laboratoriais validados, eles possuem algumas desvantagens como alto risco de perda de analitos durante a separação da amostra, uso de uma grande quantidade de solventes orgânicos tóxicos, podem ser demorados pois envolvem

preparações de amostras elaboradas e etapas de purificação, além de exigirem equipamentos sofisticados (Wang *et al.*, 2013; Lux *et al.*, 2015). Foi feita em laboratório uma cotação em 2021 por 3 empresas brasileiras que fornecem análises por cromatografia gasosa, os preços para análises (incluindo equipamentos, solventes, gases e detectores) variam de R\$60.000 a mais de R\$100.000 reais.

Tendo em vista a necessidade urgente de desenvolvimento e inovação de sistemas de monitoramento que sejam sensíveis, rápidos, específicos, baratos e sustentáveis, novas técnicas estão sendo estudadas como os imunossensores, que apresentam uma superfície onde complexos antígeno-anticorpo podem ser detectados e também convertidos em sinais elétricos e biomecânicos usando transdutores, porém ainda possuindo alcance limitado (Zhang *et al.*, 2018; Pollap e Kochana, 2019; Felebam, 2019) assim como os bioindicadores ambientais.

1.4 Bioindicadores ambientais

Bioindicadores são organismos ou características da comunidade (por exemplo, diversidade funcional ou taxonômica dessa comunidade) que são usados para avaliar e monitorar o estado do habitat em que ocorrem, incluindo mudanças ao longo do tempo e/ou seguindo perturbações específicas (Astudillo-García *et al.*, 2019). A determinação de bioindicadores apropriados é bastante crítica em programas de biomonitoramento e amplamente baseada na faixa de tolerância (ou sensibilidade) de organismos individuais à variabilidade ambiental. (Astudillo-García *et al.*, 2019).

Existem diversas aplicações para a análise de espécies indicadoras, incluindo conservação, gestão ambiental e mapeamento da paisagem. Dependendo do objetivo do estudo, os grupos selecionados podem representar diferentes características qualitativas do ecossistema, como tipos de habitat ou comunidade, estados ambientais de sucessão, ou níveis de projetos experimentais controlados. (De Cáceres *et al.*, 2010). Diversos tipos de bioindicadores já foram estudados e avaliados em ambientes aquáticos. Alguns dos melhores exemplos incluem, macrófitas, moluscos ou outros invertebrados bentônicos, peixes, fitoplâncton e algas, dentre outros, que monitoram eficientemente o ambiente aquático contaminados com metais pesados, pesticidas e poluição radioativa (Kumari, 2020).

Atualmente, os microrganismos considerados como indicadores biológicos da qualidade da água são utilizados para indicar duas situações possíveis: a contaminação fecal e a presença de

patógenos que indicam um potencial risco a saúde (Damasio, 2017). Segundo a Agência Nacional de Águas- ANA, o principal índice de qualidade da água utilizado no país é o IQA (Índice de Qualidade das Águas), que foi desenvolvido para avaliar a qualidade da água visando seu uso para o abastecimento público. Os parâmetros utilizados são majoritariamente indicadores de contaminações causadas pelo lançamento de esgoto doméstico (Estes são: oxigênio dissolvido, coliformes termotolerantes, pH, DBO, temperatura da água, nitrogênio e fósforo totais, turbidez e resíduo total), e, portanto, apresentam limitações, pois não analisam substâncias tóxicas como metais pesados, pesticidas ou hidrocarbonetos. A análise toxicológica desses compostos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), possui diretrizes que preveem o uso de equinoides assim como outros organismos do grupo dos anfípodos para ensaios ecotoxicológicos crônicos, além de análises químicas comparando os resultados obtidos com os limites máximos de tolerância estabelecidos. Portanto, o uso de microrganismos para esses tipos de detecção ainda não é definido.

2. JUSTIFICATIVA

O potencial uso de microrganismos como bioindicadores para diagnóstico de contaminações petrolíferas em ambientes marinhos, ainda é pouco explorado e não é aplicado até o momento. A definição de sua variabilidade natural sobre gradientes espaciais e temporais é fundamental para a identificação precoce e precisa desses distúrbios ambientais (citado por Glasl *et al.*, 2017); Cooper *et al.* (2009), identificou a seguinte seleção de cinco critérios a serem considerados na escolha de bioindicadores: especificidade, monotonicidade, variabilidade natural, praticidade e relevância ecológica. Com os avanços recentes em técnicas moleculares, é possível serem realizadas investigações detalhadas *in situ* da estrutura e funções dessas comunidades microbianas, gerando uma análise de dados padronizada e eficiente (Glasl *et al.*, 2017). Pela ação de indústrias petrolíferas e pelo uso de combustíveis fósseis, acidentes ambientais por derramamento de óleo e/ou seus derivados podem ser gerados. Esses derramamentos provocam enormes danos a ambientes marinhos e terrestres, pois os hidrocarbonetos do petróleo são tóxicos para a maioria dos seres vivos, além de serem resistentes à degradação se tornando um risco a todo o ecossistema. Entretanto, em ambientes contaminados com hidrocarbonetos do petróleo ocorre um enriquecimento de bactérias que possuem a capacidade de utilizar esses compostos como fonte de carbono e energia para o seu crescimento. Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos podem ser promissoras biomarcadores para detecção da contaminação por petróleo em ambientes marinhos. Os métodos já existentes para detecção de ambientes marinhos contaminados possuem diversas desvantagens quanto a sua metodologia, além de serem de alto custo e geralmente inviáveis para uma aplicação em larga escala. Assim, os biomarcadores representam uma eficiente abordagem nos estudos de avaliação do risco e impacto ambiental, pois podem detectar de forma precoce os efeitos reais que estão ocorrendo aos seres vivos em exposição a esses ambientes contaminados, além de serem uma proposta mais econômica e que permite o monitoramento de diversas amostras ao mesmo tempo. Entretanto, o biomonitoramento de ambientes marinhos para diagnóstico de contaminações petrolíferas ainda é inexplorado. Portanto, a obtenção de informações sobre a comunidade microbiana degradadora de hidrocarbonetos do petróleo dessas regiões é de extrema importância para a elaboração de estratégias de biomonitoramento nesses locais.

3 OBJETIVOS

Identificar um grupo de espécies e/ou gênero de bactérias que sirvam como ferramenta de biomonitoramento da presença de hidrocarbonetos do petróleo em ambientes marinhos.

3.1 Objetivos específicos

1. Coletar as amostras de água do mar de diferentes pontos das praias do Leme, Barra e Copacabana no Rio de Janeiro (RJ);
2. Analisar, através do sequenciamento do gene *rrs*, a distribuição da comunidade bacteriana presente nas amostras de água do mar antes e depois da contaminação por hidrocarbonetos;
3. Isolar bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos do petróleo de amostras de água do mar;
4. Analisar a capacidade de degradação de hidrocarbonetos das estirpes bacterianas isoladas através do teste de degradação de hexadecano.
5. Analisar e caracterizar, através do sequenciamento do gene *rrs* a estrutura e composição da comunidade bacteriana presente nas amostras de água marinha com o intuito de identificar a existência de grupos potencialmente bioindicadores.

4.4 Extração de DNA total das amostras

Para extração de DNA total da comunidade microbiana, o volume total de cada microcosmo foi filtrado em membranas Millipore de 0,22 μm (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) para obtenção das células microbianas. Essas membranas contendo as células microbiana foram utilizadas para extração de DNA através do kit FastDNA Spin Kit for soil, seguindo as instruções do fabricante.

4.5. Análise molecular da comunidade microbiana presente nas amostras: PCR-DGGE:

Para a análise de gel de eletroforese com gradiente desnaturante, o DNA da comunidade microbiana presente em cada amostra foi utilizado como molde para a amplificação do gene que codifica o rRNA 16S através de PCR. A reação foi realizada com iniciadores U968F e L1401R (específicos para amplificação do gene que codifica o rRNA 16S). No iniciador U968F foi acrescentado um grampo rico em nucleotídeos GC, para que o produto da amplificação por PCR possa ser utilizado em DGGE. Cada reação de PCR foi realizada em volume final de 24 μl em um tubo contendo: uma mistura de tampão GoTaq® Flexi (Promega, Madison, WI, EUA) na concentração 1X, 3,75mM de MgCl_2 , 0,2mM de cada dNTPs, 100 nM de cada iniciador, 1,25U da enzima Taq polimerase (Promega, Madison, WI, EUA), 1 μl de DNA e água Milli-Q estéril. O. Em seguida a reação foi incubada em um termociclador onde o ciclo aplicado foi: 1x (2min a 94°C); 30x (1 min a 94°C; 1 min a 55°C; 2min a 72°C); 1x (10 min a 72°C); 4°C. O produto da amplificação por PCR foi submetido a corrida eletroforética em gel de agarose.

Os produtos obtidos pela reação de PCR foram, então, utilizados na técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), possibilitando a separação desse DNA de acordo com suas sequências de pares de bases, demonstrando os perfis das comunidades bacterianas presentes nas diferentes amostras.

Para isso, os fragmentos amplificados nas PCRs foram separados em gel de poliacrilamida 8% (peso/volume) em tampão TAE 1X, contendo um gradiente linear de 40-70% dos agentes desnaturantes ureia e formamida (100% de agentes desnaturantes equivalem a 7M de ureia e 40% de formamida deionizada) (Muyzer et al., 1993). Alíquotas de 20 μl de amostra de PCR foram aplicadas no gel de DGGE. A corrida eletroforética foi realizada a 60°C no sistema “Dcode Universal Mutation Detection System” (Bio-Rad) a 65 V por 16 horas. Ao término da corrida, o gel foi corado por 40 minutos com SYBR Safe na concentração de 1:10.000, na

ausência de luz, e visualizado e digitalizado em luz UV utilizando o filtro fotográfico do sistema STORM (Amersham Biosciences).

4.6 Sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S

Para a análise de sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S, o DNA extraído de cada amostra foi quantificado com auxílio do espectrofotômetro NanoDrop 1000 (ThermoScientific, Suwanee, GA, USA). O DNA total das amostras foi então, enviado para sequenciamento através da plataforma Illumina MiSeq (<http://novogene.egnyte.com>). Posteriormente ao sequenciamento, todas as amostras de DNA foram analisadas por meio da plataforma QIIME 2 (Bolyen et al., 2018). Nessa análise, 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. As sequências de cada amostra foram classificadas em Variantes de Sequências Amplificadas (ASV, do inglês Amplicon Sequence Variants). A partir dessa informação, foram calculados os índices de alfa e beta diversidade e realizadas as análises multivariadas como escalonamento multidimensional não métrico (NMDS, do inglês Non-metrical Multidimensional Scaling) e análise das coordenadas principais (PCoA, do inglês Principal Coordinates Analysis). Por fim, a composição da comunidade microbiana foi determinada através da classificação taxonômica de cada ASV utilizando como banco de dados taxonômico, o banco de dados SILVA (Quast *et al.*, 2013).

4.7 Isolamento de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos

Ao final do período em agitação de 7 dias, foram selecionadas triplicatas mensais para o isolamento de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos. Este isolamento foi realizado em meio Marine Broth – MB. Para o isolamento, foram feitas, diluições seriadas (10^{-1} até 10^{-6}) e uma alíquota de 100 μ l das últimas três diluições (10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) foram semeadas pelo método *spread plate* em placas de Petri contendo o meio MB. Em seguida, as placas foram incubadas na temperatura de 32°C por até 7 dias. Após o crescimento bacteriano, colônias com morfotipos diferentes foram isoladas utilizando o mesmo meio de cultivo. O estoque foi realizado com as culturas puras, utilizando 900 μ l do meio MB, adicionado a glicerol (10%) e sendo estocadas a -80°C. A composição do meio utilizado se encontra no **Quadro 1**.

Quadro 1: Meio Marine Broth , descrição e a quantidade dos componentes.

Meio de cultura	Componentes do meio
	• Peptona – 5g
	• Extrato de levedura – 1g
	• Citratoférrico – 0,1g
	• Cloreto de magnésio – 8,8g
	• Sulfato de sódio – 3,24g
Marine Broth – DIFCO™ 2216 (MB)	• Cloreto de cálcio – 1,8g
	• Cloreto de potássio – 0,55g
	• Bicarbonato de sódio – 0,16g
	• Brometo de potássio – 0,08g
	• Cloreto de estrôncio – 34mg
	• Ácidobórico – 22mg
	• Silicato de sódio – 4mg
	• Fluoreto de sódio – 2,4mg
	• Nitrato de amônio – 1,6mg
	• Fosfatodissódico – 8 mg
	• Agar bacteriológico – 15g
	• Para 1000 ml de água destilada

4.8 Obtenção das células utilizadas para o teste de degradação de hidrocarbonetos:

As células lavadas utilizadas no teste de degradação de hidrocarbonetos, foram obtidas através da reativação das bactérias isoladas em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio MB. Posteriormente, esses tubos foram incubados por 48 horas a 32°C. Após o crescimento celular, 1,5 ml do crescimento bacteriano foi coletado, colocado em tubos tipo *Eppendorf* estéril e centrifugado. O *pellet* contendo as células bacterianas foi então lavado com salina

estéril 0,85% - procedimento realizado duas vezes e ressuspensão em 1 ml de meio *Bushnell Haas*.

4.9 Teste de degradação de hexadecano:

O teste de degradação de óleo cru e hexadecano foi realizado a fim de analisar a capacidade de degradação de hidrocarbonetos do petróleo por cada estirpe bacteriana isolada. Para isso, foram utilizadas placas de 24 poços. Em cada poço é adicionado 1.8 ml de meio BH, 200 µl da suspensão de células lavadas (item anterior) e 2 µl de hexadecano (degradação de hexadecano). As placas foram então incubadas por 7 dias a 32°C. A análise dos resultados foi feita somente pela observação a olho nu da turbidez nos poços contendo hexadecano. A composição do meio utilizado se encontra no **Quadro 2**.

Quadro 2: Meio *Bushnell Haas*, descrição e a quantidade dos componentes.

	<ul style="list-style-type: none"> • Sulfato de Magnésio - 0.2g
	<ul style="list-style-type: none"> • Cloreto de Cálcio - 0.02g
Bushnell-Haas Broth – DIFCO™	<ul style="list-style-type: none"> • Fosfato Monopotássico - 1,0g
	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrogenofosfato de di-amônio - 1,0g
	<ul style="list-style-type: none"> • Nitrato de potássio - 1.0g
	<ul style="list-style-type: none"> • Cloreto férrico - 0.05g
	<ul style="list-style-type: none"> • Para 1000 ml de água destilada

5 RESULTADOS

5.1 Locais, datas de coleta e características físico-químicas das amostras estudadas

As amostras utilizadas nesse estudo foram coletadas nas praias do Leme, Barra e Copacabana (as datas das coletas, os períodos de tempo, pH e a salinidade das amostras estudadas se encontram descritas no **Quadro 3**). Todas as amostras apresentaram pH neutro e salinidade de aproximadamente 3,0%, o que é característico para as amostras marinhas. Todos os 14 controles (amostras sem contaminação) utilizados no estudo foram coletados na praia da Barra no período da manhã e possuíam as mesmas características físico-químicas das demais amostras. A nomenclatura das amostras foi escolhida de acordo com: 1- Mês coleta, 2- Semana do mês, 3- Número da triplicata analisada (exemplo: M1A1 2 = Amostra do mês 1, semana 1, triplicata de numero 2).

Quadro 3: Datas, locais, períodos e características físico-químicas das amostras mensais coletadas

Nome da amostra	Local de Coleta	Data das Coletas	Período	Salinidade	pH
M1A1	Barra	20/08/2019	manhã	3,0%	neutro
M1A2	Leme	25/08/2019	tarde	3,0%	neutro
M1A3	Leme	02/09/2019	tarde	3,0%	neutro
M1A1 2	Barra	20/08/2019	manhã	3,0%	neutro
M1A1 3	Barra	20/08/2019	manhã	3,0%	neutro
M1A4	Leme	10/04/2019	manhã	3,0%	neutro
M1A4 2	Leme	10/04/2019	manhã	3,0%	neutro
M1A4 3	Leme	10/04/2019	manhã	3,0%	neutro
M2A1	Barra	19/09/2019	manhã	3,0%	neutro
M2A1 2	Barra	10/09/2019	manhã	3,0%	neutro
M2A1 3	Barra	19/09/2019	manhã	3,0%	neutro

M2A2	Barra	25/09/2019	manhã	3,0%	neutro
M2A2 1	Barra	25/09/2019	manhã	3,0%	neutro
M2A2 2	Barra	25/09/2019	manhã	3,0%	neutro
M2A3	Barra	03/10/2019	manhã	3,0%	neutro
M2A4	Copacabana	11/10/2019	tarde	3,0%	neutro
M2A4 2	Copacabana	11/10/2019	tarde	3,0%	neutro
M2A4 3	Copacabana	11/10/2019	tarde	3,0%	neutro
M3A1 1	Barra	25/10/2019	manhã	3,0%	neutro
M3A1 2	Barra	25/10/2019	manhã	3,0%	neutro
M3A1 3	Barra	25/10/2019	manhã	3,0%	neutro
M3A2	Barra	01/11/2019	manhã	3,0%	neutro
M3A3	Barra	12/11/2019	manhã	3,0%	neutro
M4A1	Copacabana	20/11/2019	manhã	3,0%	neutro
M5A1 1	Barra	08/01/2020	manhã	3,0%	neutro
M5A1 2	Barra	08/01/2020	manhã	3,0%	neutro
M5A1 3	Barra	08/01/2020	manhã	3,0%	neutro
M5A41	Barra	29/01/2019	manhã	3,0%	neutro
M5A4 2	Barra	29/01/2020	manhã	3,0%	neutro
M5A4 3	Barra	29/01/2019	manhã	3,0%	neutro
M3A2 1	Barra	01/11/2019	manhã	3,0%	neutro
M3A2 2	Barra	01/11/2019	manhã	3,0%	neutro
M4A1 1	Copacabana	20/11/2019	manhã	3,0%	neutro
M4A1 2	Copacabana	20/01/2019	manhã	3,0%	neutro
M4A3 1	Copacabana	06/12/2019	manhã	3,0%	neutro

M4A3 2	Copacabana	06/12/2019	manhã	3,0%	neutro
M4A3 3	Copacabana	06/12/2019	manhã	3,0%	neutro
M5A2 1	Barra	16/01/2020	manhã	3,0 %	neutro
M5A2 2	Barra	16/01/2019	manhã	3,0 %	neutro
M5A2 3	Barra	16/01/2019	manhã	3,0 %	neutro

5.2 Análise DGGE

Os resultados preliminares obtidos pela análise de DGGE das amostras dos meses 1, 2 e 3 (em ordem temporal) mostraram que os perfis das comunidades bacterianas presentes nas diferentes amostras analisadas são diversos e variam de acordo com a data das coletas. Ademais, pode-se verificar bandas que aparecem em todas as amostras (**Fig 3**).

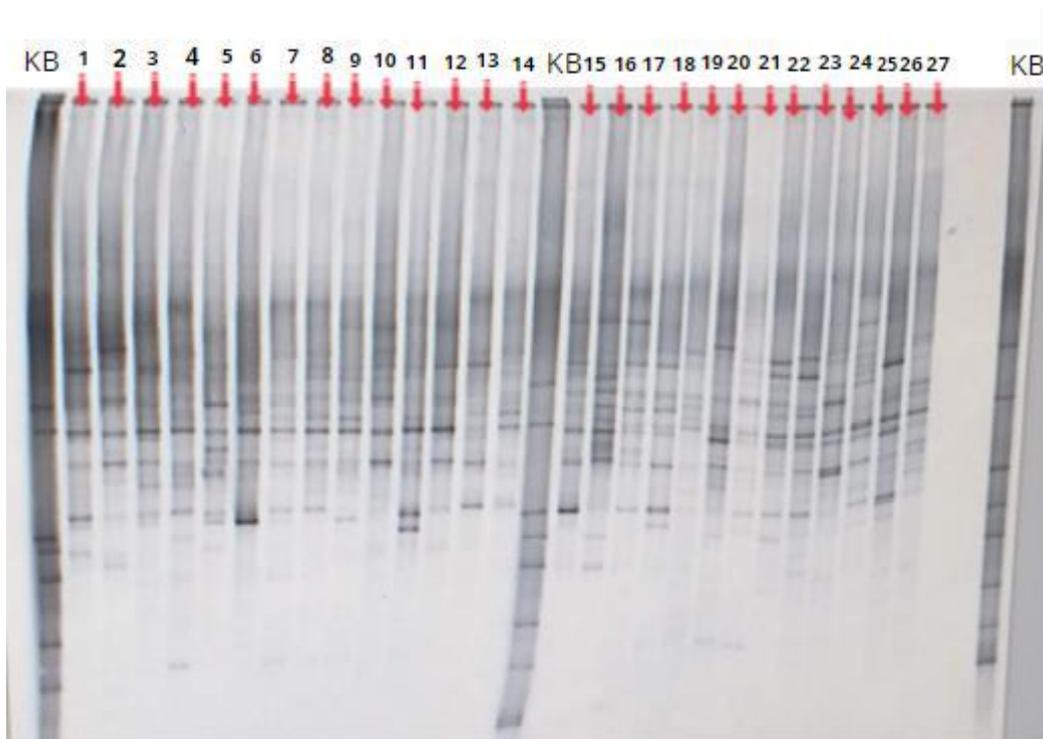


Figura 3: Análise da comunidade microbiana presente nas amostras por DGGE. Ordem das amostras: KB 1- M1A3; 2- M1A2; 3- M2A4; 4- M1A1; 5- M2A4; 6- M2A3; 7- M1A4; 8- M1A1; 9- M2A1; 10- M1A2; 11- M2A1; 12- M1A2; 13- M3A1; 14- M1A4; KB1; 15- M2A2; 16- M3A1; 17- M2A2; 18- M2A2; 19- M1A4; 20- M2A3; 21- M2A1; 22- M3A1; 23- M1A3; 24- M2A3; 25- M1A3; 26- M2A4; 27- M1A1; KB.

5.3 Caracterização da comunidade bacteriana presente nas diferentes amostras

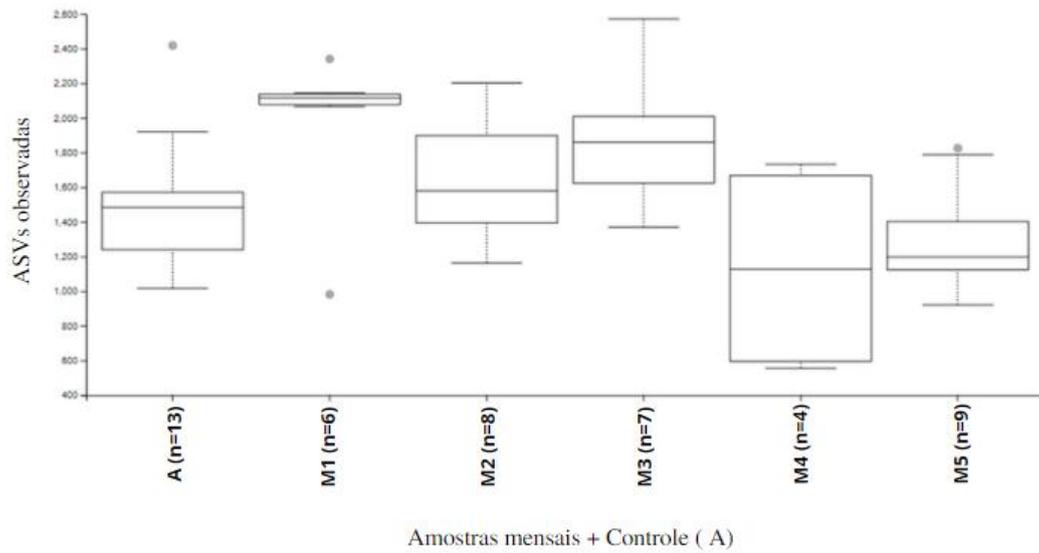
A estrutura e a composição da comunidade bacteriana presente nas amostras de água do mar foram analisadas através de sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S. Para este objetivo, foi utilizado o programa QIIME 2 onde todas as sequências foram, primeiramente, filtradas removendo sequências quiméricas e de baixa qualidade. Somente foram mantidas sequências que apresentavam em sua composição um tamanho aproximado de 250 pares de base (pb). Como resultados dessa primeira etapa de análise, foi obtido um total de 3079150 sequências (o número de sequências por amostra variou de 61482 a 88245. Para a análise de alfa e beta diversidade, o número de sequências por amostra foi normalizado para 61482. Posteriormente, essas sequências foram agrupadas em variantes de sequências amplificadas (ASVs - *Amplicon Sequence Variant*) e a distribuição das diferentes ASVs foi utilizada para calcular índices de alfa-diversidade e beta-diversidade. Em todos os casos, para facilitar a interpretação dos resultados, as amostras foram agrupadas, primeiramente, pelo mês de coleta (M1, M2, M3, M4 e M5) e, posteriormente, pela presença (S) ou ausência (N) de contaminação.

5.4 Análise da distribuição de variantes de sequências amplificadas (ASVs)

O resultado da distribuição de ASVs nas amostras de cada mês mostrou que a média de ASVs observada nas amostras variou de 1290 ASVs nas amostras do M5 a 1960 ASVs nas amostras do M1. Com base no teste estatístico de Kruskal-Wallis, considerando $p \leq 0.05$, foi observado que os valores médios de ASVs observados nas amostras dos M1, M2, M4 e M5 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em comparação ao controle (A) (**Quadro 4**). Entretanto, o número de ASVs nas amostras do M3 foi maior do que o observado no controle (A). Em comparação ao M1, as amostras dos M4 e M5 apresentaram menores médias de ASVs (**Fig 4 A**)

Quando a distribuição de ASVs foi analisada considerando a presença ou ausência de contaminação, o resultado mostrou que as amostras contaminadas (S) apresentaram uma média de 1575 ASVs enquanto as amostras não contaminadas (N) apresentaram uma média de 1501 ASVs. A análise de Kruskal-Wallis mostrou que os valores de ASVs detectados nas amostras N e S são estatisticamente diferentes, considerando $p = 0.05$ (**Fig 4 B**).

A



B

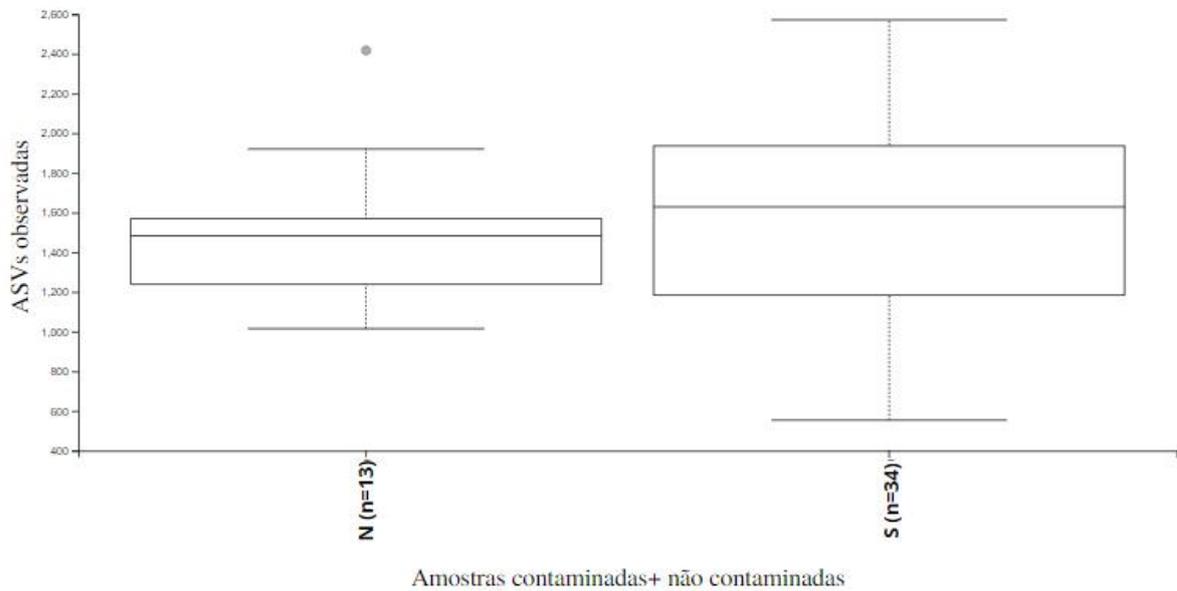


Figura 4 Análise de alfa-diversidade das ASVs presentes nas amostras, (A) levando em consideração a comparação entre as amostras mensais e o controle positivo (B) levando em consideração a comparação entre amostras não contaminadas e contaminadas.

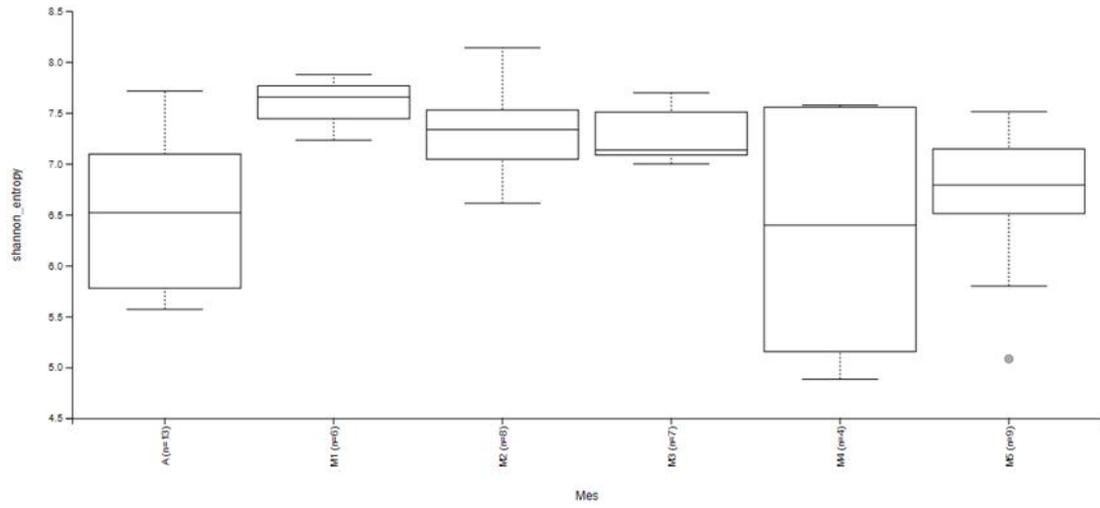
Quadro 4: Análise estatística de Kruskal-Wallis baseado nos valores de distribuição de ASVs das amostras mensais e controle (A).

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
A (n=13)	M1 (n=6)	3,39	0,07	0,16
	M2 (n=8)	0,63	0,43	0,49
	M3 (n=7)	4,08	0,04	0,16
	M4 (n=4)	0,21	0,65	0,65
	M5 (n=9)	2,90	0,09	0,17
M1 (n=6)	M2 (n=8)	2,40	0,12	0,20
	M3 (n=7)	0,73	0,39	0,49
	M4 (n=4)	4,55	0,03	0,16
	M5 (n=9)	5,56	0,02	0,14
M2 (n=8)	M3 (n=7)	1,08	0,30	0,42
	M4 (n=4)	1,04	0,31	0,42
	M5 (n=9)	3,70	0,05	0,16
M3 (n=7)	M4 (n=4)	2,89	0,09	0,17
	M5 (n=9)	6,73	0,01	0,14
M4 (n=4)	M5 (n=9)	0,38	0,54	0,58

5.5 Análise da diversidade da comunidade bacteriana: Índice de Shannon

O resultado da estimativa de alfa diversidade da comunidade microbiana através da análise do índice de Shannon pode ser observado nas **Figuras 5A e 5B** na **Tabela 3**. Os resultados demonstraram que a média do índice de Shannon variou de 6,31 em M4 a 7,59 em M1. A análise do teste estatístico de Kruskal-Wallis (**Quadro 5**), considerando $p = 0.05$, mostrou que as médias do índice de Shannon observadas nas amostras do M1, M2 e M3 foram maiores do que a média observada na amostra A. Adicionalmente, foi observado que a média do índice de Shannon do M5 menor do que a observada em M1 ($p=0.05$) (Fig 5 A). Quando o índice de Shannon foi analisado comparando as amostras contaminadas (S) e não contaminadas (N) o resultado mostrou que a média observada em S de 6,87 foi maior do que a observada em N de 6,51 ($p = 0.05$) (**Fig 5 B**).

A



B

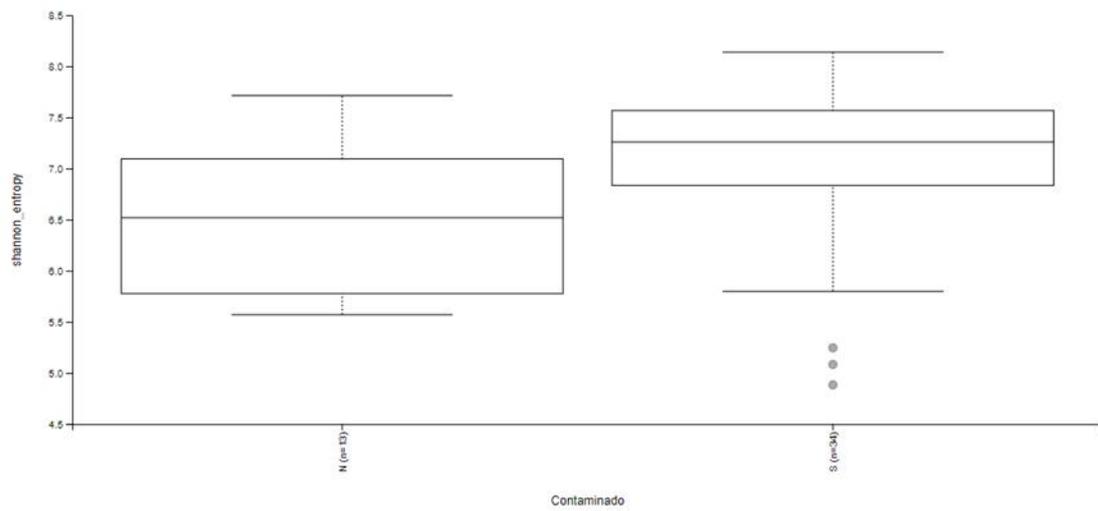


Figura 5 - Gráfico boxplot da distribuição dos valores de estimativa da alfa diversidade (A) entre as amostras mensais (B) entre as amostras contaminadas e não contaminadas (índice de Shannon).

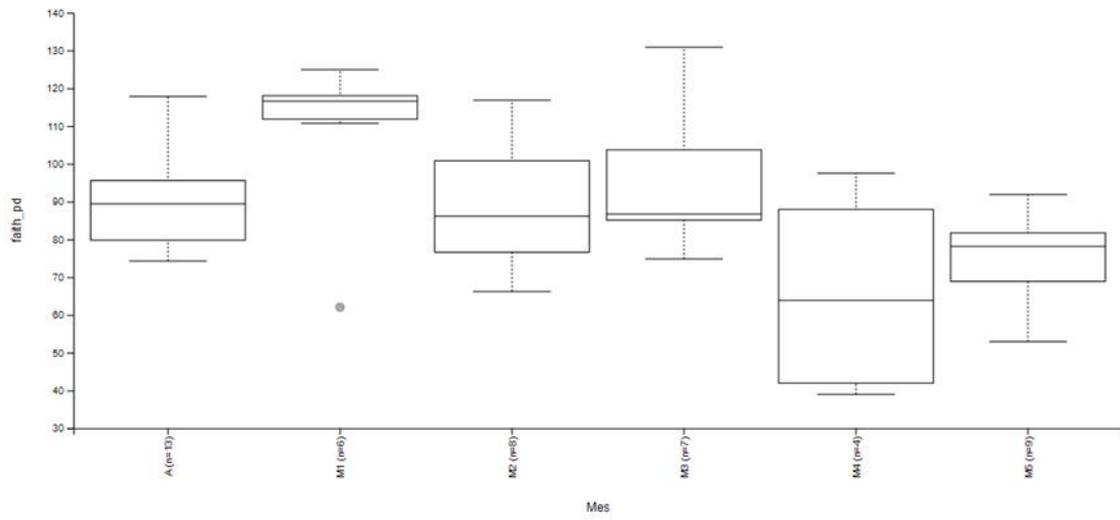
Quadro 5: Análise estatística de Kruskal-Wallis baseado no índice de Shannon das amostras mensais e controle (A).

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
A (n=13)	M1 (n=6)	8,38	0,00	0,05
	M2 (n=8)	5,71	0,02	0,08
	M3 (n=7)	4,75	0,03	0,11
	M4 (n=4)	0,05	0,82	0,94
	M5 (n=9)	0,40	0,53	0,66
M1 (n=6)	M2 (n=8)	2,02	0,16	0,26
	M3 (n=7)	3,45	0,06	0,14
	M4 (n=4)	2,91	0,09	0,17
	M5 (n=9)	7,35	0,01	0,05
M2 (n=8)	M3 (n=7)	0,00	1,00	1,00
	M4 (n=4)	0,46	0,50	0,66
	M5 (n=9)	3,34	0,07	0,14
M3 (n=7)	M4 (n=4)	0,57	0,45	0,66
	M5 (n=9)	3,43	0,06	0,14
M4 (n=4)	M5 (n=9)	0,02	0,88	0,94

5.6 Análise da alfa diversidade da comunidade bacteriana: Índices Faith-PD

O resultado da estimativa de alfa diversidade da comunidade microbiana através da análise do índice de Faith-PD pode ser observado nas **Figuras 6A e 6B** e na **Quadro 5**. Os resultados demonstraram que a média do índice de Faith-DP variou de 108,13 em M1 a 66,03 em M4. A análise do teste estatístico de Kruskal-Wallis (**Quadro 6**), considerando $p = 0.05$, mostrou que, em comparação com A, a média do índice de Faith-DP foi maior em M1 e menor em M5 (**Fig 6A e Quadro 6**). Adicionalmente, as amostras M4 e M5 apresentaram menores índices de Faith-PD do que a amostra M1, **Fig 6A**. Quando o índice de Faith-PD foi analisado comparando as amostras contaminadas (S) e não contaminadas (N) o resultado mostrou que a diversidade filogenética observada em S não apresentou diferença estatística em comparação com a observada em N. **Fig 6B**.

A



B

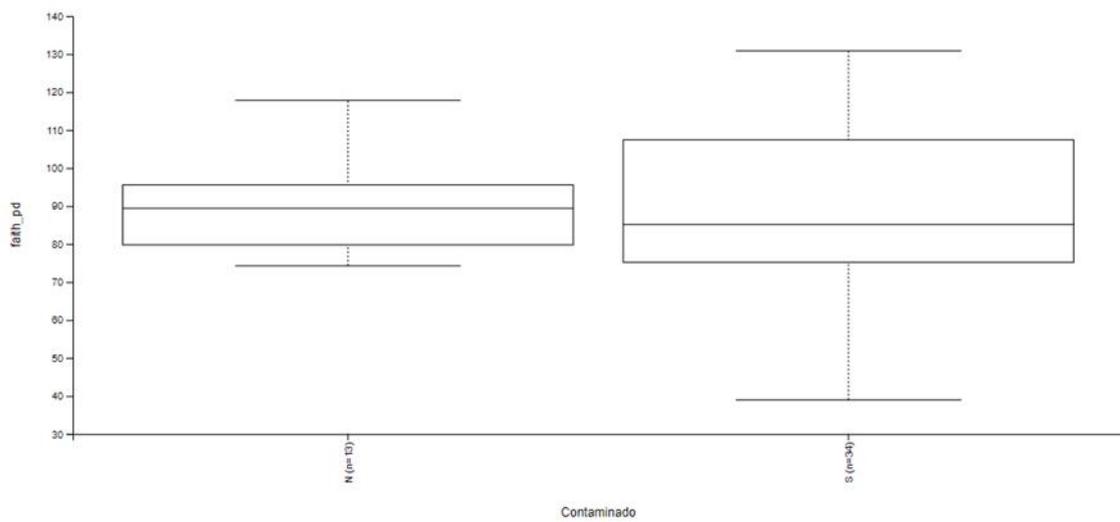


Figura 6: Gráfico boxplot acima demonstra a variação de alfa diversidade a partir da análise por grupos filogenéticos através da análise por Faith-PD para as diferentes amostras contaminadas (**Fig 6A**) e em comparação de amostras não contaminadas com as contaminadas com hidrocarbonetos (**Fig 6B**).

Quadro 6: Análise estatística de Kruskal-Wallis baseado no índice de Faith-PD das amostras mensais e controle (A).

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
A (n=13)	M1 (n=6)	4,43	0,04	0,12
	M2 (n=8)	0,08	0,77	0,77
	M3 (n=7)	0,13	0,72	0,77
	M4 (n=4)	1,28	0,26	0,43
	M5 (n=9)	5,00	0,03	0,12
M1 (n=6)	M2 (n=8)	2,82	0,09	0,23
	M3 (n=7)	1,00	0,32	0,43
	M4 (n=4)	4,55	0,03	0,12
	M5 (n=9)	5,01	0,03	0,12
M2 (n=8)	M3 (n=7)	0,48	0,49	0,61
	M4 (n=4)	1,04	0,31	0,43
	M5 (n=9)	2,08	0,15	0,32
M3 (n=7)	M4 (n=4)	1,75	0,19	0,35
	M5 (n=9)	4,26	0,04	0,12
M4 (n=4)	M5 (n=9)	0,10	0,76	0,77

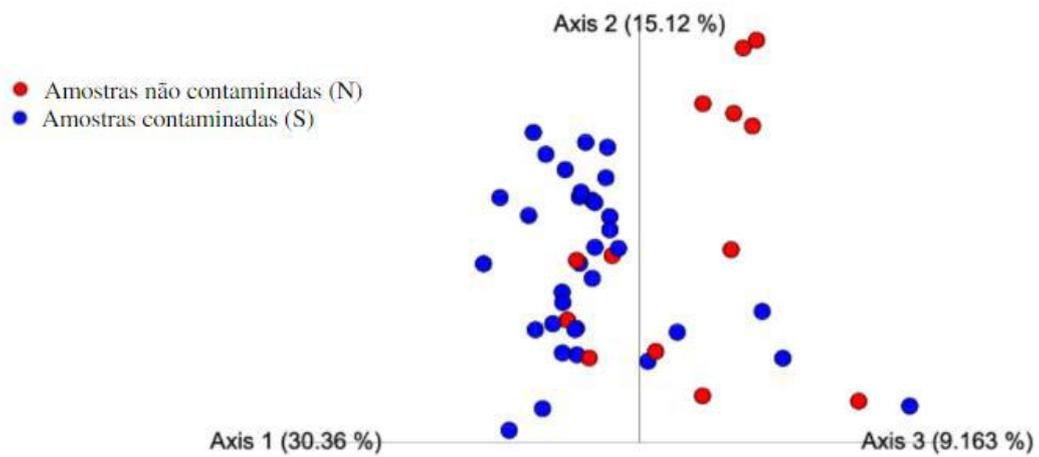
5.7 Análise da diversidade da comunidade bacteriana

Para analisar a estrutura da comunidade bacteriana presente nas diferentes amostras, foram geradas ordenações multidimensionais em Análises de Coordenadas Principais (PCoA) baseadas em matrizes de distância da beta-diversidade calculadas seguindo a métrica filogenética Unifrac (*unweighted e weighted* Unifrac). Assim como nas análises anteriores, para facilitar a interpretação dos resultados, as amostras foram agrupadas por mês de coleta e, também, pela presença ou ausência de contaminação.

O resultado da PCoA baseado na métrica *Weighted* Unifrac leva em consideração não só a composição da comunidade bacteriana mas, também, a abundância de cada grupo presente nas diferentes amostras. Como observado na (**Fig 7A**) há uma separação espacial entre a maioria das amostras que receberam hexadecano (S) das que não receberam (N) (**Fig 7A**). Entretanto,

a análise de PCoA não mostrou uma nítida separação das amostras em relação ao mês de coleta (Fig 7B)

A



B

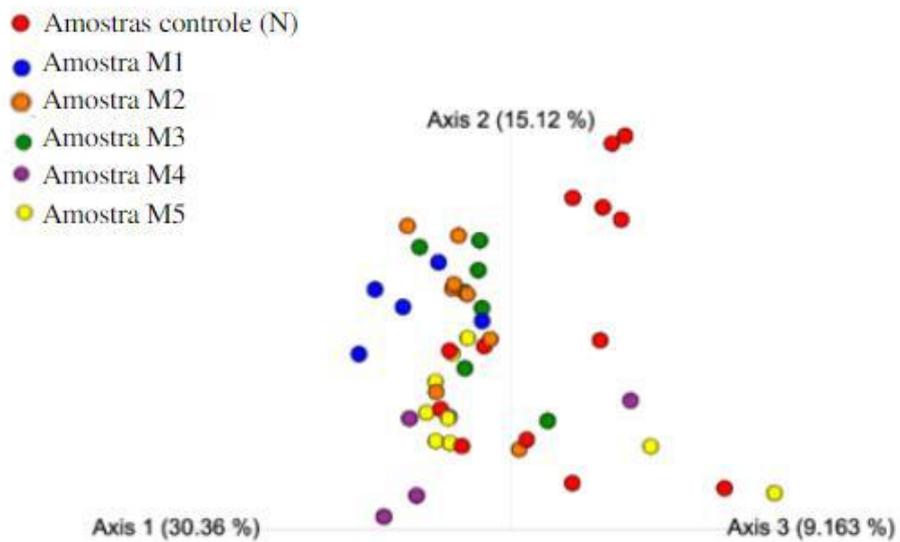
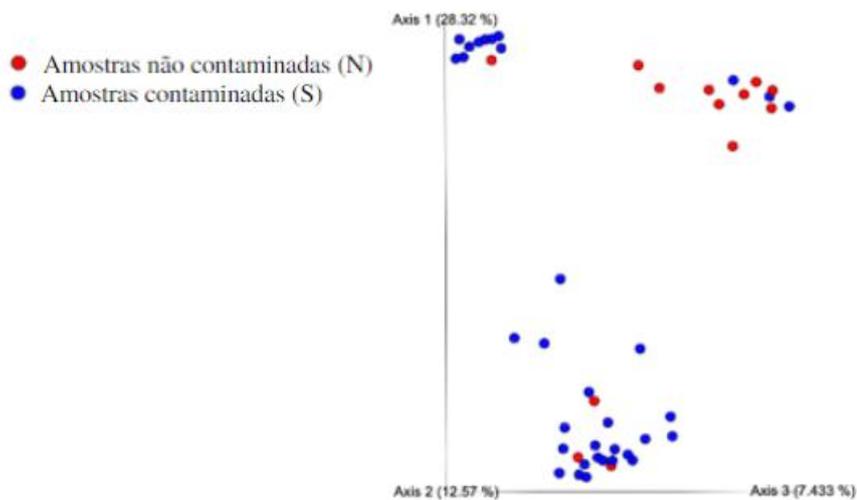


Figura 7. Análise de PCoA das amostras estudadas baseado na métrica *Weighted* Unifrac. As amostras se apresentam coloridas de acordo com (A) a separação entre amostras contaminadas e não contaminadas e (B) entre as amostras dos diferentes meses em relação a amostras sem contaminação.

Adicionalmente, foi feita a análise baseada na métrica *Unweighted* Unifrac, que leva em consideração a composição da comunidade bacteriana sem considerar a abundância de cada grupo. O resultado da PCoA mostrou, em geral, uma nítida separação das amostras contaminadas (S) e das amostras não contaminadas (N) (**Fig 8A**). Entretanto, foram formados dois grupos de amostras contaminadas. A separação das amostras contaminadas foi determinada pelo mês da coleta de cada amostra, sendo que, principalmente, as amostras do M1 ficaram separadas das amostras M4 e M5 (**Fig 8B**)

A



B

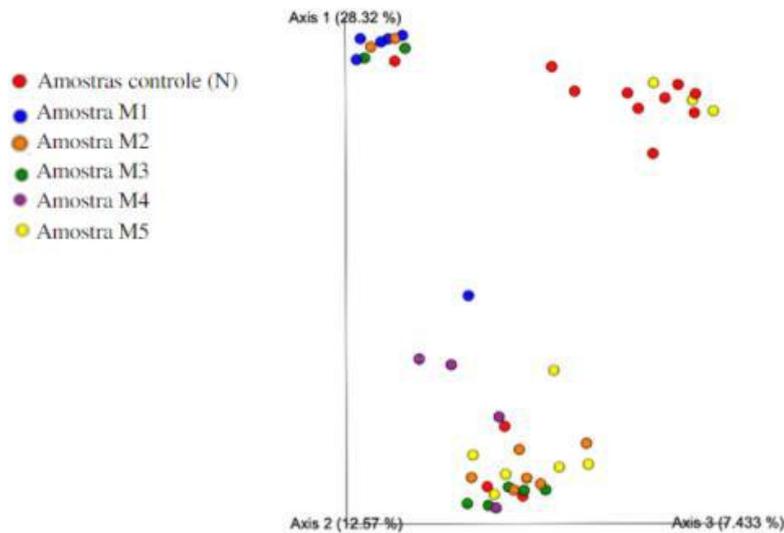
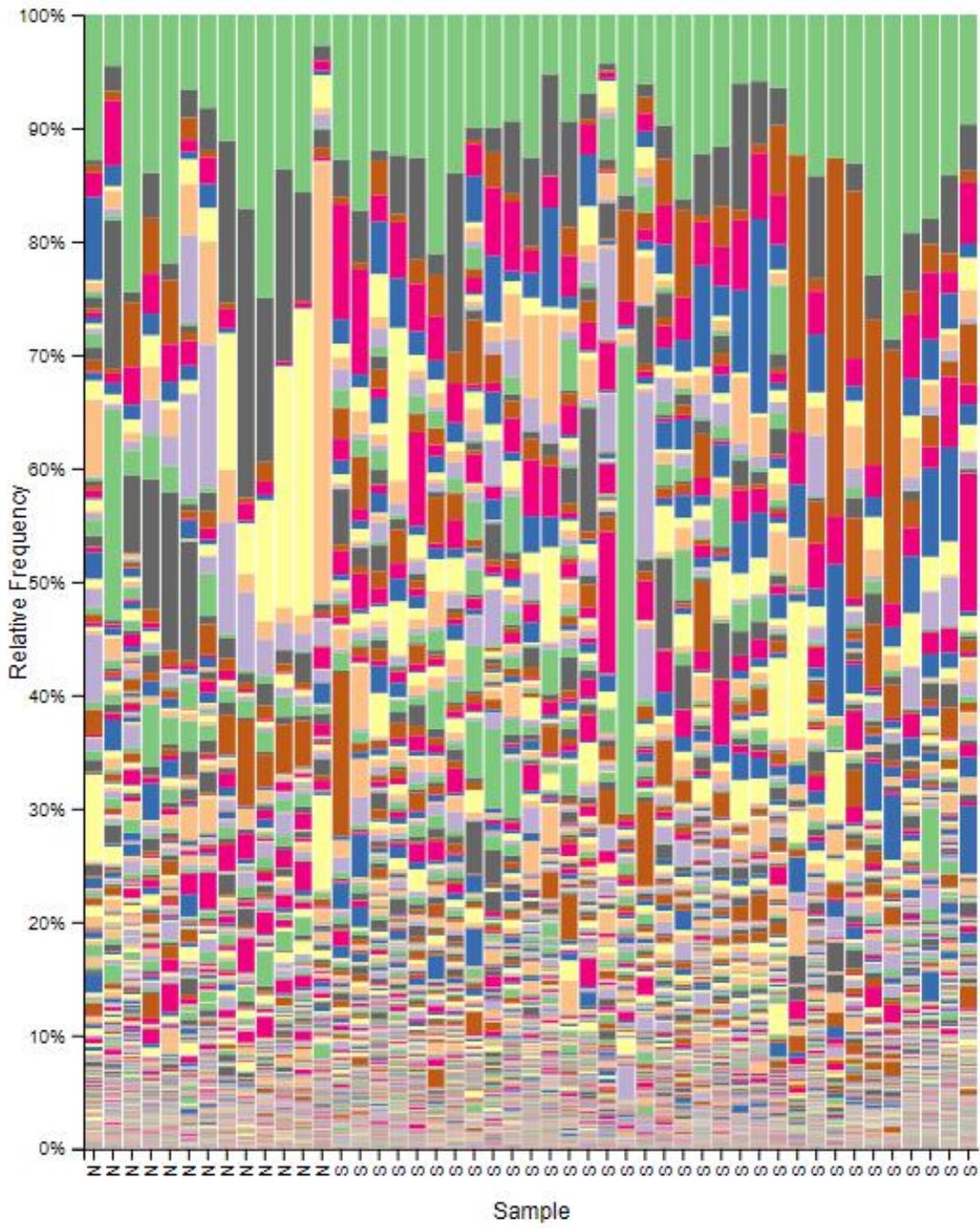


Figura 8. Análise de PCoA das amostras estudadas baseado na métrica *Unweighted Unifrac*. As amostras se apresentam coloridas (A) levando em consideração a comparação entre amostras contaminadas e não contaminadas (B) levando em consideração a comparação entre as amostras mensais e o controle positivo.

5.8 Identificação dos grupos bacterianos predominantes encontrados nos diferentes microcosmos

A análise taxonômica foi utilizada com o objetivo de identificar os principais grupos selecionados pela contaminação com hidrocarbonetos. Como essa etapa do estudo possui potencial de desenvolvimento tecnológico, incluindo a formulação de patente, os nomes dos diferentes grupos taxonômicos observados nas amostras foram omitidos. A **Figura 9** mostra a grande diversidade microbiana observada tanto em amostras contaminadas como as não contaminadas. Entretanto, como demonstrado na figura **9B**, principalmente 5 grupos bacterianos (A, B, C, D e E) apresentaram um aumento da abundância relativa nas amostras contaminadas. Estudos posteriores serão realizados para avaliar a aplicabilidade desses grupos como biomarcadores da presença de hidrocarbonetos em amostras de água marinha.

A



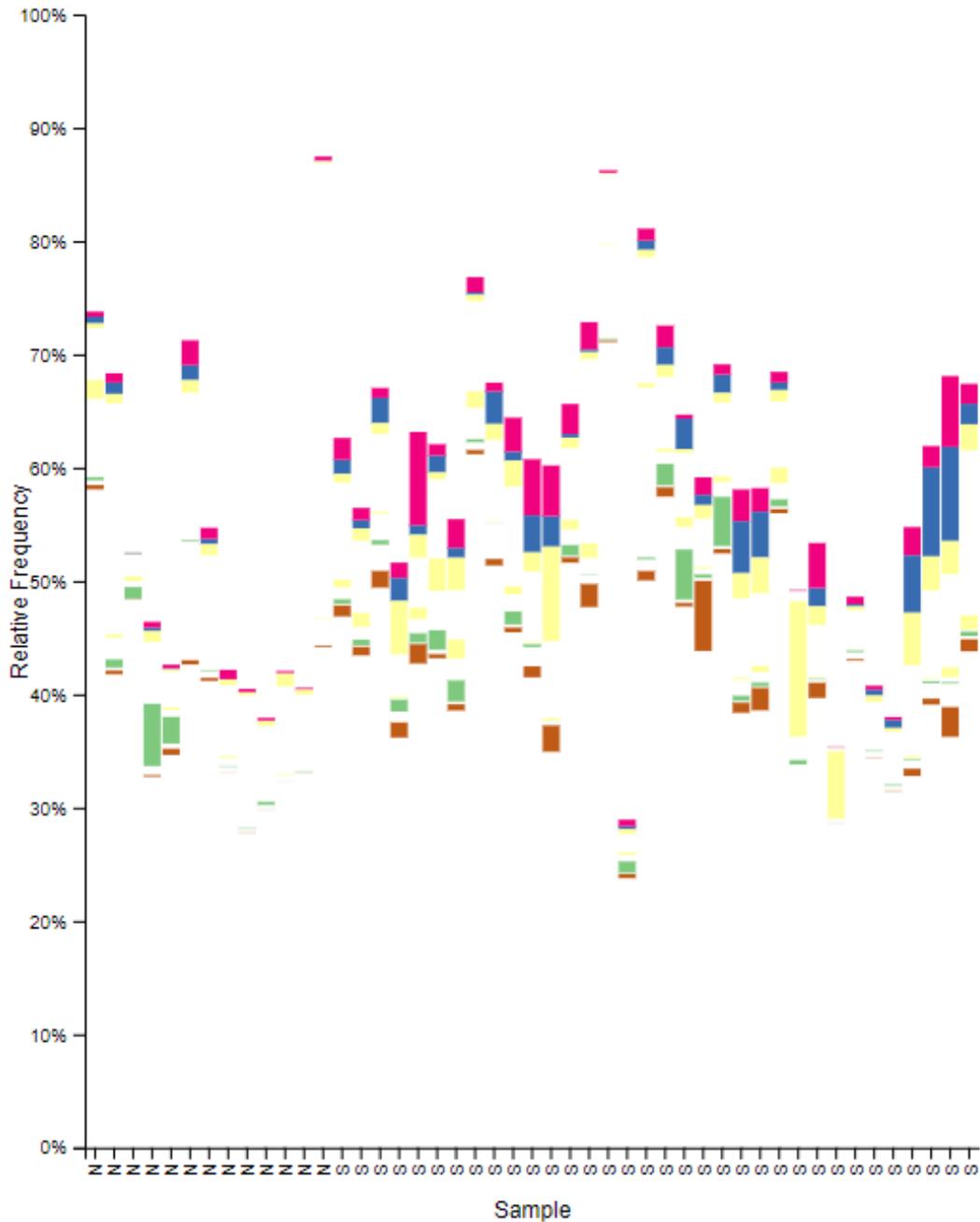
B

Figura 9. Gráfico de abundância relativa dos gêneros observados nas diferentes amostras. A identificação taxonômica dos diferentes grupos microbianos foram, propositalmente, omitidos. (A) Panorama geral da distribuição dos diferentes gêneros observados e (B) seleção dos 5 principais gêneros enriquecidos pela presença de hidrocarbonetos do petróleo.

5.9 Isolamento das estirpes bacterianas degradadoras de hidrocarbonetos

Após 7 dias da simulação da contaminação com hexadecano, o isolamento das bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos foi realizado em meio MB. Um total de 87 estirpes bacterianas foi isolado, incluindo 29 estirpes bacterianas do mês 1, 34 do mês 3 e 24

isolados do mês 5. Os resultados dos testes de degradação mostraram que nas amostras foram identificadas, respectivamente, 24 degradadoras de hexadecano do mês 1, 20 do mês 3 e 10 do mês 5.

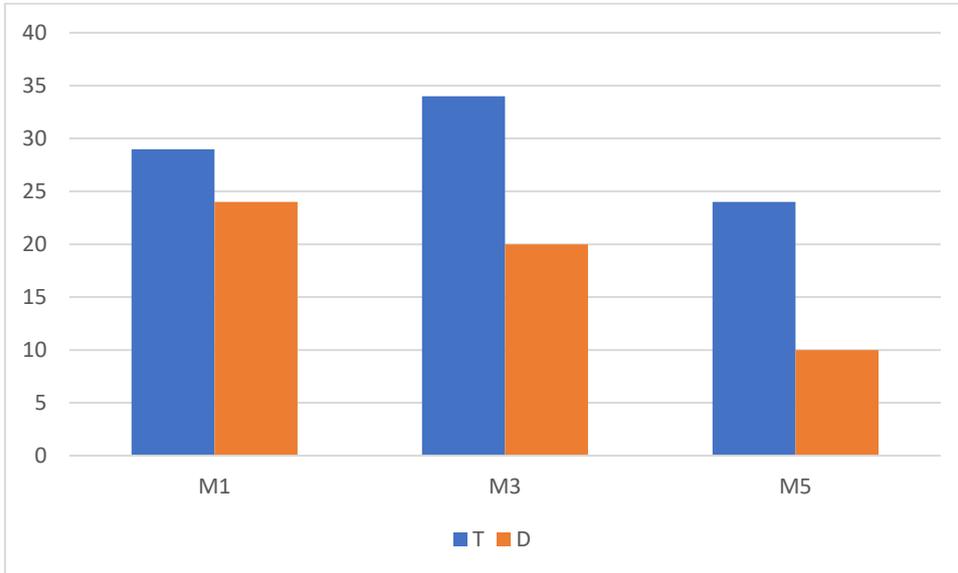


Figura 10: Representação gráfica da quantidade de isolados obtidos das diferentes amostras (T) e do total de isolados positivos para degradação de hidrocarbonetos (D).

6 DISCUSSÃO

A poluição do meio ambiente por derramamentos de petróleo é extremamente grave, pois os hidrocarbonetos de petróleo são tóxicos para grande parte das formas de vida. Entretanto, a contaminação dos ambientes marinhos e terrestres por meio de petróleo bruto é bastante comum devido ao seu uso extensivo de combustíveis fósseis, a operações de descarte inapropriados e derramamentos acidentais (Zenati *et al.*, 2018). Estima-se que cerca de 1,7-8,8 milhões de toneladas de hidrocarbonetos de petróleo são lançadas anualmente no ambiente marinho. Desse total, 90% dessa contaminação é atribuída a acidentes devido a falhas humanas (Ossai *et al.*, 2019). O Rio de Janeiro é o estado que possui a maior produção de petróleo comparado aos outros estados do país, e, por isso, suas praias estão sujeitas a contaminações constantemente. Nesse sentido, a formulação de ferramentas biotecnológicas para monitorar ou biorremediar ambientes marinhos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo deve ser considerada um ponto estratégico do desenvolvimento do estado do Rio de Janeiro.

O destino final dos hidrocarbonetos no ambiente marinho é determinado pelo potencial das comunidades microbianas em nichos individuais ou seus efeitos sinérgicos. Embora as

populações microbianas degradadoras de hidrocarbonetos sejam ubíquas em ambiente marinho, elas existem como uma fração menor da comunidade pré-derramamento (Neethu *et al.*, 2019). Nesse sentido, a detecção e identificação de microrganismos chaves que respondem às entradas de hidrocarbonetos no ambiente marinho são os primeiros passos para a elaboração de estratégias adequadas para remediar contaminações ambientais (Gontikaki, 2018). Entretanto, o potencial natural de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos para aplicações biotecnológicas de biomonitoramento atualmente não é utilizado devido a lacunas em nosso conhecimento da distribuição microbiana em ambientes marinhos contaminados com petróleo.

Com isso, nosso estudo se propôs a avaliar a estrutura e composição da comunidade microbiana presente em amostras marinhas contaminadas com hidrocarbonetos do petróleo. Nossa hipótese era de que existem grupos especializados em degradar hidrocarbonetos em ambientes marinhos e que a identificação desses grupos permitirá o desenvolvimento de uma ferramenta biotecnológica de biomonitoramento. Para atingir esse objetivo, foram avaliadas amostras de água marinha coletadas ao longo de 5 meses em praias da cidade do Rio de Janeiro, permitindo a avaliação temporal da comunidade microbiana responsável por degradar hidrocarbonetos em ambientes marinhos. Da mesma maneira, foram utilizadas amostras coletadas em diferentes praias (praias de Copacabana, Leme e Barra da Tijuca). Essa coleta em diferentes praias nos permitiu avaliar se a localidade da amostra influencia na comunidade microbiana degradadora de hidrocarbonetos. Nossos resultados preliminares obtidos inicialmente pela análise de fingerprint (DGGE), demonstraram que os perfis das comunidades bacterianas presentes nas amostras contaminadas com hidrocarbonetos do petróleo são diversos e variam de acordo com as coletas. Entretanto, algumas bandas (que representam espécies bacterianas dominantes na comunidade microbiana) foram observadas em todas as amostras contaminadas por hidrocarbonetos. Um ponto que merece destaque é que a técnica de DGGE possui limitações para avaliar comunidades microbianas complexas. Por exemplo, somente populações que representam mais de 1% do total da comunidade bacteriana podem ser detectadas por esse método (M'peko, 2003).

Para, então, poder avaliar com mais detalhes a comunidade microbiana presente nas diferentes amostras, neste estudo foi realizado o sequenciamento massivo do gene que codifica o rRNA 16S através da plataforma Illumina MiSeq. Posteriormente essas sequências foram analisadas através do programa QIIME. Foram obtidas um total de 3079150 sequências do gene que codifica o rRNA 16S e, por final, foram analisadas em total de 61482 sequências por amostra. Com base nos dados de sequenciamento, a alfa e beta diversidade da comunidade microbiana

presente nas amostras de água marinha contaminadas com hidrocarbonetos do petróleo foram avaliadas. A mudança estrutural da comunidade bacteriana é um importante indicador da diversidade ecológica (SHI et al, 2020). A diversidade local (ou diversidade alfa) é o número de espécies numa pequena área de habitat homogêneo. Esta é sensível a como se define local e habitat e a quão intensamente a amostra se encontra na comunidade. Por outro lado, o estudo da diversidade beta permite investigar a influência de fatores locais e regionais na estrutura das comunidades microbianas, e, segundo Ward. (1999), esse componente da diversidade provê uma nova perspectiva para o conhecimento de áreas a serem preservadas (Pires, 2014).

As sequências do gene que codifica o rRNA 16S obtidas neste estudo foram agrupadas em variantes de sequências amplificadas (ASVs - Amplicon Sequence Variant) e a distribuição das diferentes ASVs foi utilizada para calcular índices de alfa-diversidade e beta-diversidade. O resultado da distribuição de ASVs nas amostras de cada mês mostrou que a média de ASVs observada nas amostras variou de 1290 ASVs nas amostras do M5 a 1960 ASVs nas amostras do M1. A maioria das amostras não obteve diferenças estatisticamente significativas em comparação ao controle (A) com base no teste estatístico de Kruskal-Wallis, considerando $p = 0.05$. Entretanto, quando a distribuição de AVSS foi analisada considerando a presença ou ausência de contaminação, o resultado mostrou que não houve alteração significativa estatisticamente.

A análise de alfa-diversidade baseadas no índice de Shannon mostrou que as médias observadas nas amostras do M1, M2 e M3 foram maiores do que a média observada na amostra A, segundo análise do teste estatístico de Kruskal-Wallis (**Quadro 5**), considerando $p = 0.05$. Adicionalmente, a análise do índice de Shannon mostrou que a diversidade observada nas amostras contaminadas (S) foi maior do que a observada nas amostras não contaminadas (N) (considerando $p = 0.05$). Esse mesmo resultado não foi observado através da análise de diversidade filogenética baseada no índice de Faith-PD. Nesse caso, quando o índice de Faith-PD foi analisado comparando as amostras contaminadas (S) e não contaminadas (N) o resultado mostrou que a diversidade filogenética observada em S não apresentou diferença estatística em comparação com a observada em N. Esses resultados indicaram que, embora a diversidade da comunidade microbiana (incluindo equilíbrio de distribuição entre os grupos microbianos) tenha aumentado significativamente nas amostras contaminadas (S), esse aumento não foi causado por um enriquecimento de novos grupos taxonômicos nas amostras. Ou seja, a contaminação reestruturou a comunidade microbiana presente nas amostras contaminadas com hidrocarbonetos, enriquecendo grupos microbianos já existentes na água marinha. Embora o

aumento da diversidade microbiana total da comunidade das amostras contaminadas com hidrocarbonetos não seja esperado, o mesmo resultado foi observado por Novello (2019).

Para analisar a estrutura da comunidade bacteriana presente nas diferentes amostras, foram geradas ordenações multidimensionais em Análises de Coordenadas Principais (PCoA) baseadas em matrizes de distância da beta-diversidade calculadas seguindo a métrica filogenética Unifrac (unweighted e weighted Unifrac). Os resultados das PCoA mostraram, em todos os casos, uma separação espacial entre a maioria das amostras que receberam hexadecano (S) das amostras não contaminadas (N), assim com também observado por Rahmeh *et al.* (2021) onde as amostras demonstraram clara separação em ambientes contaminados e não contaminados com óleo. Estes resultados indicaram que a contaminação com hexadecano levou a modificações da composição da estrutura da comunidade microbiana. Entretanto, embora a análise de PCoA baseada na métrica do weighted Unifrac não tenha mostrado uma nítida separação das amostras em relação ao mês de coleta (**Fig 7B**), a análise da PCoA baseada na métrica do unweighted Unifrac mostrou que a composição da comunidade microbiana presente nas amostras contaminadas do M1 é diferente da composição da comunidade microbiana das amostras contaminadas do M4 e M5. No geral, esses resultados nos indicam que: (i) grupos microbianos degradadores de hidrocarbonetos foram enriquecidos nas amostras marinhas contaminadas com hexadecano (weighted e unweighted Unifrac), (ii) a composição da comunidade microbiana presente na amostra de água marinha contaminada pode variar ao longo dos diferentes períodos do ano (unweighted Unifrac); e (iii) entretanto, grupos microbianos dominantes representam a comunidade microbiana de amostras marinhas contaminadas com hidrocarbonetos do petróleo (weighted Unifrac).

Por fim, para a elaboração de uma ferramenta biotecnológica, a identificação dos grupos majoritários nas amostras contaminadas com hidrocarbonetos do petróleo é essencial. Nesse sentido, a análise taxonômica foi utilizada com o objetivo de identificar os principais grupos selecionados pela contaminação com hidrocarbonetos. Com base nesses resultados, pode-se verificar uma grande diversidade microbiana tanto em amostras contaminadas (S) como nas não contaminadas com hidrocarbonetos do petróleo (N). Nossa análise da comunidade microbiana identificou 5 grupos que apresentaram um aumento da abundância relativa nas amostras contaminadas com hidrocarbonetos, em comparação com as amostras não contaminadas. Embora o nome desses gêneros microbianos tenham sido omitidos no presente estudo, eles representam gêneros de bactérias que foram previamente descritas como degradadoras de hidrocarbonetos. Adicionalmente, de um total de 87 bactérias isoladas das

amostras de água marinha contaminadas com hidrocarbonetos do petróleo, 54 estirpes bacterianas foram capazes de degradar hidrocarbonetos. Esses grupos poderão ser utilizados futuramente como ferramentas de biomonitoramento de ambientes marinhos contaminados com hidrocarbonetos do petróleo.

7 CONCLUSÕES

- ✓ Foi demonstrada uma grande diversidade microbiana tanto em amostras contaminadas (S) como nas não contaminadas com hidrocarbonetos do petróleo
- ✓ A contaminação reestruturou a comunidade microbiana presente em amostras marinhas, enriquecendo grupos microbianos já existentes.
- ✓ Os resultados das análises de beta diversidade indicaram que a contaminação com hexadecano levou a modificações da composição e da estrutura da comunidade microbiana.
- ✓ Foram identificados 5 generos bacterianos que apresentaram um aumento da abundância relativa nas amostras contaminadas com hidrocarbonetos, em comparação com as amostras não contaminadas.
- ✓ Foram isoladas um total de 87 estirpes das amostras de água marinha contaminadas com hidrocarbonetos do petróleo, 54 estirpes bacterianas foram capazes de degradar hidrocarbonetos.

REFERÊNCIAS:

- Andrade, Juliano de Almeida; Augusto, Fabio; Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes (2010). Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética química*, v. 35, n. 3, p. 17-43.
- Astudillo-García C., Hermans SM., Stevenson B., Buckley HL., Lear G. (2019). Microbial assemblages and bioindicators as proxies for ecosystem health status: potential and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol.* 103(16):6407-6421
- Atlas, R. M. (1995). Biorremediation of Petroleum Pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, p. 317-327.
- Atlas, Ronald M., Hazen, Terry C. (2011). Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in US history.
- Bolyen, Evan *et al.* (2018). QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. *PeerJ Preprints*.
- Cerqueira W. R. P., Batista R. N., Santos V. O., Barbarino J. L., Quaglio G. S., Reis P. H. S. M. (2020). Registro de petróleo em poríferos e cnidários durante o impacto agudo de derramamento no Nordeste brasileiro em 2019. *Scientia Plena*, v. 16, n. 8.
- Cooper TF., Gilmour JP., Fabricius KE., (2009). Bioindicators of changes in water quality on coral reefs: review and recommendations for monitoring programmes. *Coral Reefs* v. 28, n. 3, p. 589–606.
- Colwell, Rita R., Walker, John D., Cooney, Joseph J. (1977). Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *CRC critical reviews in microbiology*, v. 5, n. 4, p. 423-445.
- Damasio, Denis. (2017). Bioindicadores na avaliação ambiental em um rio de abastecimento público. 45 f.
- Das N., Chandran P. (2010). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol.*
- De Cáceres M., Legendre P., Moretti M (2010). Improving indicator species analysis by combining groups of sites.
- Dos Santos, H. F., Cury, J. C., Do Carmo, F. L., Dos Santos, A. L., Tiedje, J., Van Elsas, J. D., ... & Peixoto, R. S. (2011). Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. *PloS one*, 6(3), e16943.
- Felemban, Shifa., VAZQUEZ., Patricia., MOORE, Eric. Future trends for in situ monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources: The role of immunosensing techniques. *Biosensors*, v. 9, n. 4, p. 142, 2019
- Glasl B., Webster NS., Bourne DG., (2017). Microbial indicators as a diagnostic tool for assessing water quality and climate stress in coral reef ecosystems. *Mar Biol* p.164 - 91.
- Gontikaki, E. *et al.*, (2018) Hydrocarbon-degrading bacteria in deep-water subarctic sediments (Faroe-Shetland channel). *Journal of applied microbiology*, v. 125, n. 4, p. 1040-1053
- Head, I., Jones, D. & Röling, W. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat Rev Microbiol* v. 4, p. 173–182.

- Holliger C., Gaspard S., Glod G., Heijman C., Schumacher W., Schwarzenbach RP., Vazquez F., (1997). Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 20, n. 3-4, p. 517-523.
- Imron, M. F., Kurniawan, S. B., Ismail, N., 'Izzati, & Abdullah, S. R. S. (2020). Future challenges in diesel biodegradation by bacteria isolates: A review. *Journal of Cleaner Production*, 251, 119716.
- Jurelevicius, D., Alvarez, V. M., Marques, J. M., de Sousa Lima, L. R., Dias, F., & Seldin, L. (2013). Bacterial community response to petroleum hydrocarbon amendments in freshwater, marine, and hypersaline water-containing microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 79, n. 19, p. 5927-5935.
- Keramea, P., Spanoudaki, K., Zodiatis, G., Gikas, G., Sylaios, G. Oil Spill Modeling: A Critical Review on Current Trends, Perspectives, and Challenges. *J. Mar. Sci. Eng.* 2021, 9, 181.
- Kostka, J. E., Prakash, O., Overholt, W. A., Green, S. J., Freyer, G., Canion, A., Delgardio, J., Norton, N., Hazen, T. C., & Huettel, M. (2011). Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. *Applied and environmental microbiology*, v. 77, n. 22, p. 7962-7974.
- Kumari¹, Dipty., PAUL, Dilip Kumar. Assessing the role of bioindicators in freshwater ecosystem. 2020.
- Leahy, J.H., Colwell, R., (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* v. 54, n. 3, p. 305–315.
- Lux, G., Langer, A., Pschenitzka, M., Karsunke, X., Strasser, R., Niessner, R., Knopp, D., Rant, U. (2015). Detection of the carcinogenic water pollutant benzopyrene with an electro-switchable biosurface. *Anal. Chem.* 2015, v.87, p. 4538–4545
- Mariano, Jacqueline Barboza (2001). Impactos ambientais do refino de petróleo. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 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.
- M'peko, Ana Luiza., (2003) Avaliação da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) em espécies de *Microcystis* (cianobactérias) no sistema de lagoas de estabilização do município de São Lorenzo da Serra (Vale do Ribeira de Iguape)-SP. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo
- Muyzer, Gerard, de Waal, Ellen Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*. V. 59, p. 695-700.
- Neethu, C. S. *et al.*, (2019) Oil-spill triggered shift in indigenous microbial structure and functional dynamics in different marine environmental matrices. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 1-13
- Ossai, I. C., Ahmed, A., Hassan, A., & Hamid, F. S. (2019). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology & Innovation*
- Pang, Jinling., Yuan, Dongxing., Huang, Xiaojia., (2018) On-line combining monolith-based in-tube solid phase microextraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the sensitive monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in complex samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1571, p. 29-37
- Pena, P. G. L., Northcross, A. L., Lima, M. A. G. de, & Rêgo, R. de C. F. (2020). Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 36, n. 2.

Peixoto, Ferdyanne Beatriz Sabóia (2017). Microorganismos degradadores de petróleo isolados de ambientes aquáticos do entorno da Base Petrolífera de Urucu, Coari, Amazonas-Brasil. 140 f.

Perdigão, Rafaela *et al.* (2021) Optimization of an autochthonous bacterial consortium obtained from beach sediments for bioremediation of petroleum hydrocarbons. *Water*, v. 13, n. 1, p. 66.

Pires, Denise Amazonas P667d Diversidade (alfa, beta e gama) da comunidade fitoplanctônica de quatro reservatórios do Alto Tietê, estado de São Paulo, com diferentes graus de trofia / Denise Amazonas Pires -- São Paulo, 2014.

Pollap, A., Kochana, J. (2019). Electrochemical Immunosensors for Antibiotic Detection. *Biosensor*, v. 9, p. 61

Rahmeh, Rita *et al.*, (2021) Insights into bacterial community involved in bioremediation of aged oil-contaminated soil in arid environment. *Evolutionary Bioinformatics*, v. 17, p. 117

SB Batista., AH Mounteer; FR Amorim., MR Tótola (2006). Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de biosurfactante / bioemulsificante em locais contaminados com petróleo, v. 97 n. 6, p. 868-875.

Shi, Ke *et al.* Study on the degradation performance and bacterial community of bioaugmentation in petroleum-pollution seawater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 8, n. 4, p. 103900, 2020.

Sousa, A. B. S., Silveira M., Costa, T. M. DA. (2014). A responsabilidade dos Estados no que concerne à poluição marítima em decorrência de derrame de hidrocarbonetos. *Revista Direito E-nergia*, v. 7, n. 1, p. 80-105.

Tewari, S., & Sirvaiya, A. (2015). Oil spill remediation and its regulation. *International Journal of Engineering Research and General Science*, v. 1(6), p. 1-7.

Tiwari, B., Manickam, N., Kumari, S., & Tiwari, A. (2016). Biodegradação e dissolução de hidrocarbonetos poliaromáticos por *Stenotrophomonas* sp. *Bioresource Technology*, v. 216, p. 1102–110.

Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277–286.

Wagener, A. L., Carreira, R. S., Hamacher, C., Scofield, A. L. (2012). hidrocarbonetos em água do mar: resultados do monitoramento em área de produção de petróleo na bacia do ceará. *Geochimica Brasiliensis*, v. 20, n. 1.

Wang, W., Ma, R., Wu, Q., Wang, C., Wang, Z. (2013). Magnetic microsphere-confined graphene for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples coupled with high performance liquid chromatography–fluorescence analysis. *J. Chromatogr.* v. 1293, p. 20–27.

Zenati, Billal *et al.*, (2018) A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 154, p. 100-107.

Zhang, W., Liu, Q.X., Guo, Z.H., Lin, J.H. (2018). Practical Application of Aptamer-Based Biosensors in Detection of Low Molecular Weight Pollutants in Water Sources. *Molecules*, v. 23, p. 344.

Zhang, Qiongyao *et al.*, (2020) Progress in the analytical research methods of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 43, n. 13-14, p. 425-444.

Zhang, Baiyu *et al.*, (2019) Marine oil spills—oil pollution, sources and effects. In: *World seas: an environmental evaluation*. Academic Press. p. 391-406.