



**Edna Marisa
Moreira de Almeida**

**Efeito do mercúrio em comunidades bacterianas
associadas a plantas**



**Edna Marisa
Moreira de Almeida**

**Efeito do mercúrio em comunidades bacterianas
associadas a plantas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Anabela Pereira, investigadora em pós-doutoramento, CESAM e co-orientação da Doutora Isabel Henriques, investigadora em pós-doutoramento, CESAM.

Dedico este trabalho aos companheiros de todos os dias.

o júri

Presidente

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia
professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Anabela de Oliveira Pereira
investigadora em pós-doutoramento, CESAM - Centro de Estudos do Ambiente e do Mar,
Universidade de Aveiro

Doutora Isabel da Silva Henriques
investigadora em pós-doutoramento, CESAM- Centro de estudos do Ambiente e do Mar,
Universidade de Aveiro

Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves
investigador auxiliar, CESAM-Centro de estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro

agradecimentos

À Doutora Anabela Pereira queria agradecer a constante disponibilidade e a ajuda que sempre se dispôs a oferecer.

À Doutora Isabel Henriques por todo o apoio e encorajamento ao longo deste trabalho, um muito obrigado.

Ao professor Doutor António Correia pela motivação constante que incute no grupo.

Aos companheiros de laboratório, Juliana, Marta, Nádia, João, Susana entre outros, agradeço o carinho, a paciência e a disponibilidade para comigo.

Aos meus colegas de Mestrado que proporcionaram excelentes momentos passados em Aveiro.

À Susana pelos momentos de amizade e entreaajuda, assim como os momentos de diversão e aqueles em que foste o meu maior apoio. Muito obrigada Amiga!

À Sónia Pereira, Teresa Fonseca e Patrícia Domingues pelos almoços e conversas diárias ao longo deste ultimo ano! Vocês são para sempre!

Ao João Metelo, pelo apoio indispensável na fase final deste trabalho, obrigado capitão!

À família que esteve sempre presente.

palavras-chave

Mercúrio, ria de Aveiro, metilação do mercúrio, *Halimione portulacoides*, comunidades microbianas, PCR-DGGE.

resumo

As áreas estuarinas são zonas muito interessantes uma vez que constituem barreiras naturais à erosão costeira, servem de habitat para uma ampla variedade de espécies. Por estas e por outras razões, estas zonas tornaram-se muito atrativas para o estabelecimento do ser humano, promovendo, de uma forma geral, o desenvolvimento urbano, industrial e agrícola. Consequentemente, a vulnerabilidade dos ecossistemas pela exposição aos mais diversos poluentes aumentou consideravelmente. De entre esses poluentes destaca-se o mercúrio, um metal de alto risco para a saúde humana incluído na “Lista de Substâncias Prioritárias” na Diretiva Quadro da Água. O mercúrio é um metal tóxico proveniente de fontes naturais e antropogénicas. Nos sapais, grande parte deste mercúrio fica depositado em sedimentos mais superficiais, apresentando um elevado grau de toxicidade para a biota aí presente. Esta elevada deposição influencia obviamente, e em grande medida, as comunidades microbianas presentes neste ambiente. As comunidades microbianas presentes nos sedimentos podem estar ou não associadas à rizosfera de plantas. Este fato causa diferenças a nível estrutural nestas mesmas comunidades pelas diferenças nutritivas existentes quando na presença ou ausência de planta. Por outro lado, pensa-se que a planta desempenha um papel desintoxicante do mercúrio dos sedimentos. O papel da planta nas comunidades, quer na transformação do mercúrio quer na modificação do estado nutricional podem ser fatores importante na composição destas comunidades. Este trabalho tem como objetivos estudar a diversidade, equitabilidade e dinâmica de comunidades bacterianas de microcosmos com sedimentos contaminados com mercúrio e analisar o efeito da planta na diversidade e dinâmica destas comunidades microbianas. Para tal, foi utilizada uma abordagem independente do cultivo baseada na técnica de PCR-DGGE. A análise de *clustering* das amostras e os valores obtidos para os índices de diversidade e equitabilidade, apontam para uma grande influência da rizosfera da planta na estrutura das comunidades microbianas associadas, relativamente a comunidades microbianas de sedimentos não colonizados. A estratégia utilizada parece ser apropriada pela sua reprodutibilidade e robustez, permitindo uma imagem clara dos tipos bacterianos selecionados pelo respetivo ambiente.

keywords

Mercury, ria de Aveiro, mercury methylation, *Halimione portulacoides*, microbial communities, PCR-DGGE.

abstract

The interest in estuarine areas emerged since they constitute natural barriers to coastal erosion and are habitat for a wide variety of species. For these and other reasons, these areas have become very attractive for the establishment of human populations, promoting, in general, urban development, industry and agriculture. Consequently, the vulnerability of ecosystems by exposure to various pollutants increased considerably. Among these stands out the pollutants mercury, a metal at high risk for human health was included in the "priority list" in the Water Framework Directive.

Mercury is a toxic metal derived from natural and anthropogenic sources. In marshes, much of this mercury is deposited in surface sediments and once is not associated to any known biochemical function, displays a high degree of toxicity to biota. This high deposition influences obviously and largely, the microbial communities present in this environment.

The microbial communities present in sediments may or may not be associated with the plant rhizosphere. This led to structural differences in these communities by nutritional differences existing in the presence or absence of plant. On the other hand, it is thought that the plant plays a role in detoxifying mercury from sediments. The role of the plant in microbial communities, in the transformation of mercury and in modification of the nutritional factors, may be important in the composition of these communities.

This work aims to study the diversity, equitability and dynamics of bacterial communities in microcosms with contaminated sediments with mercury and analyse the effect of plant in diversity and dynamics of microbial communities. We used a cultivation-independent approach based on PCR-DGGE.

The clustering analysis of the samples and the values obtained for the indices of diversity and equitability, suggest an influence of the plant rhizosphere in microbial communities structure associated comparatively to microbial communities from non-colonized sediments.

The strategy seems to be appropriate for its robustness and reproducibility, allowing a clear picture of the bacterial types selected by the respective environment.

Índice

LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS	IV
ABREVIATURAS.....	V
1. Introdução.....	1
1.1. Mercúrio como poluente	3
1.1.1. Ciclo do mercúrio.....	5
1.1.2. Exemplo de ambientes contaminados com mercúrio.....	8
1.1.3. Sapais.....	9
1.2. <i>Halimione portulacoides</i>	11
1.2.1. <i>Halimione portulacoides</i> e relação com o mercúrio	12
1.2.2. Importância da utilização da planta <i>Halimione portulacoides</i>	14
1.3. Comunidades microbianas e o mercúrio	15
1.3.1. Influência das comunidades na descontaminação.....	17
1.3.2. Mecanismos de resistência	18
1.3.3. Exemplos de microrganismos resistentes ao mercúrio	21
1.4. Comunidades microbianas e planta	26
1.5. Aplicações Biotecnológicas dos microrganismos resistentes ao mercúrio na descontaminação e recolha do metal.....	27
1.6. Estratégia e objetivos do trabalho.....	28
2. Material e Métodos.....	29
2.1. Descrição do problema	31
2.2. Obtenção e nomenclatura das amostras.....	32
2.3. Extração de DNA microbiano das amostras de sedimento	34
2.4.1. Reação de PCR	35
2.4.2. Análise em gel de Agarose.....	36
2.4.3. Condições do DGGE	38
2.5. Análise.....	40

3.	Resultados	41
3.1.	Extração do DNA microbiano dos sedimentos.	43
3.2.	Amplificação de uma porção da região V3 do gene do rRNA 16S.....	44
3.3.	Perfis de DGGE.....	45
3.4.	Análise dos perfis de DGGE resultantes	49
3.4.1.	Amostras de sedimento com rizosfera (P)	49
3.4.2.	Amostras de sedimento (S)	51
3.5.	Amostras do tempo 0	53
3.6.	Amostras do tempo 1	54
3.7.	Amostras do tempo 2	54
3.8.	Análise de <i>clustering</i> de todas as amostras.....	56
3.9.	Índices de diversidade, H, e de equitabilidade, J.....	58
4.	Discussão	63
4.1.	DGGE	67
4.2.	Similaridades entre perfis de DGGE.....	68
4.3.	Diversidade e equitabilidade	72
5.	Conclusões.....	75
5.1.	Conclusões	77
6.	Perspetivas futuras.....	79
6.1.	Atualidade.....	81
6.2.	Continuação futura do trabalho	82

Índice de figuras

Figura 1: Tipos de emissões de mercúrio existentes ^[1]	3
Figura 2: Ciclo biogeoquímico do mercúrio ^[7]	5
Figura 3: Ciclo global do mercúrio em ambientes aquáticos (adaptado) ^[11]	6
Figura 4: <i>Halimione portulacoides</i>	11
Figura 5: Operação mer. Figura ilustrativa do mecanismo de metilação do mercúrio ^[56]	18
Figura 6: <i>Desulfovibrio vulgaris</i> , um exemplo de uma SRB importante na metilação do mercúrio ^[73]	24
Figura 7: A: Localização da Ria de Aveiro. B: Concentração de mercúrio total (μ g/g de peso seco) em sedimentos superficiais da Ria de Aveiro ^[72]	31
Figura 8: Representação sequencial dos passos de construção dos microcosmos. (1) Local não contaminado de recolha de sedimento e planta no estuário do Mondego; (2) Corte da planta e introdução em solução nutritiva; (3) Sedimento desprovido de macrofauna para o qual as plantas foram transferidas; (4) Aclimatização dos microcosmos sob condições controladas; (5) Transferência para sedimento proveniente da Baía do Laranjo; (6) Amostragem.	32
Figura 9: Transferência do sedimento recolhido dos microcosmos para tubos com <i>beads</i> provenientes do kit.....	34
Figura 10: Gel de agarose 0,8% correspondente a DNA total extraído de amostras de rizosfera com 6 meses de exposição ao mercúrio (T2 P). As amostras indicadas com P1 a P5 correspondem aos diferentes microcosmos construídos que sofreram estas condições e as letras a, b e c correspondem a réplicas recolhidas de cada um dos microcosmos. São também indicados na imagem os pesos moleculares referentes ao marcador de pesos moleculares utilizado.....	43
Figura 11: Gel de agarose a 1,5% com fragmentos correspondentes à região V3 do rRNA 16S amplificados por PCR a partir da amostra de DNA total de amostras T2 P. As amostras indicadas com P1 a P5 correspondem aos diferentes microcosmos construídos que sofreram estas condições e as letras a, b e c correspondem a réplicas recolhidas de cada um dos microcosmos. São também indicados na imagem os pesos moleculares referentes ao marcador de pesos moleculares utilizado.....	44
Figura 12: Géis de DGGE correspondentes a todos os tipos de amostras analisadas: (a), amostras S do tempo 0, (b), amostras P do tempo 0, (c), amostras S do tempo 1, (d), amostras P do tempo 1, (e), amostras S do tempo 2 e (f), amostras P do tempo 2. As amostras indicadas com P1 a P5 (rizosfera) e S1 a S5 (sedimento) correspondem aos diferentes microcosmos construídos que sofreram estas condições e as letras a, b e c correspondem a réplicas recolhidas de cada um desses microcosmos.....	46
Figura 13: Dendrograma das amostras de rizosfera, elaborado de acordo com as semelhanças estruturais inferidas pela posição das bandas referentes ao rDNA 16S, separadas por DGGE. Aspectos relevantes para discussão relativamente às percentagens de similaridade encontram-se assinalados no dendrograma.	50
Figura 14: Dendrograma das amostras de sedimento, elaborado de acordo com as semelhanças estruturais inferidas pela posição das bandas referentes ao rDNA 16S, separadas por DGGE. Aspectos relevantes para discussão relativamente às percentagens de similaridade encontram-se assinalados no dendrograma.	52

Figura 15: Dendrograma das amostras T0, elaborado de acordo com as semelhanças estruturais inferidas pela posição das bandas referentes ao rDNA 16S, separadas por DGGE.....	53
Figura 16: Dendrograma das amostras T1, elaborado de acordo com as semelhanças estruturais inferidas pela posição das bandas referentes ao rDNA 16S, separadas por DGGE.....	54
Figura 17: Dendrograma das amostras T2, elaborado de acordo com as semelhanças estruturais inferidas pela posição das bandas referentes ao rDNA 16S, separadas por DGGE.....	55
Figura 18: Dendrograma obtido após análise de todas as amostras, elaborado de acordo com as semelhanças estruturais inferidas pela posição das bandas referentes ao rDNA 16S, separadas por DGGE.	57
Figura 19: Notícia recente acerca da temática estudada.....	81

Índice de tabelas

Tabela 1: Estirpes bacterianas identificadas a partir do rDNA 16S, de amostras de água e sedimentos contaminados com mercúrio ^[66]	22
Tabela 2: <i>Primers</i> universais utilizados para amplificar a região V3 do rDNA 16S a partir de DNA total de amostras de sedimento.	35
Tabela 3: Concentrações e volumes utilizados dos componentes da mistura para o PCR.	36
Tabela 4: Composição das soluções desnaturantes dos géis de DGGE.....	38
Tabela 5: Índices de diversidade e de equitabilidade de todos os tempos de amostragem, de sedimento com e sem planta e ainda de todos os microcosmos montados (1 a 5). Devido à reprodutibilidade das réplicas a, b e c foi efetuada uma média dos índices obtidos, assim como dos desvios padrão (σ) e o valor inserido como valor do respetivo microcosmo.	60

Índice de gráficos

Gráfico 1: Representação gráfica da média dos valores do índice de Shannon-Weaver das réplicas a, b e c de cada microcosmo, com o respetivo desvio padrão, em amostras de rizosfera.	61
Gráfico 2: Representação gráfica da média dos valores do índice de Shannon-Weaver das réplicas a, b e c de cada microcosmo, com o respetivo desvio padrão, em amostras de sedimento.....	61

Abreviaturas

DGGE -*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

DNA- Ácido desoxirribonucleico

d’NTP- Didesoxiribonucleotideo tri-fosfato

EDTA- Ácido Etilenodiaminotetracético

Hg- Mercúrio

P- Sedimento colonizado, rizosfera

pb- Pares de bases

PCR - *Polimerase chain reaction*

p/v- Peso por volume

rDNA -Genes que codificam para o RNA ribossomal

S- Sedimento sem rizosfera

T0, T1, T2- Tempo de incubação dos microcosmos

TEMED- Tetrametil etileno diamida

μl-Microlitro

1. Introdução

1.1. Mercúrio como poluente

O mercúrio (Hg) é o único metal que caracteristicamente está no estado líquido em condições de temperatura e pressão normais. O mercúrio é reconhecido como um poluente global preocupante uma vez que pode ser tóxico para todos os organismos vivos. Os casos existentes de ecossistemas contaminados com mercúrio são mais comumente associados a certas atividades das últimas décadas, como a queima de combustíveis fósseis, a produção de ligas metálicas, descargas de indústrias de cloro, soda cáustica e de celulose, manipulação de resíduos e o seu tratamento. Na Figura 1 estão representadas algumas das formas de emissão de mercúrio para a atmosfera.

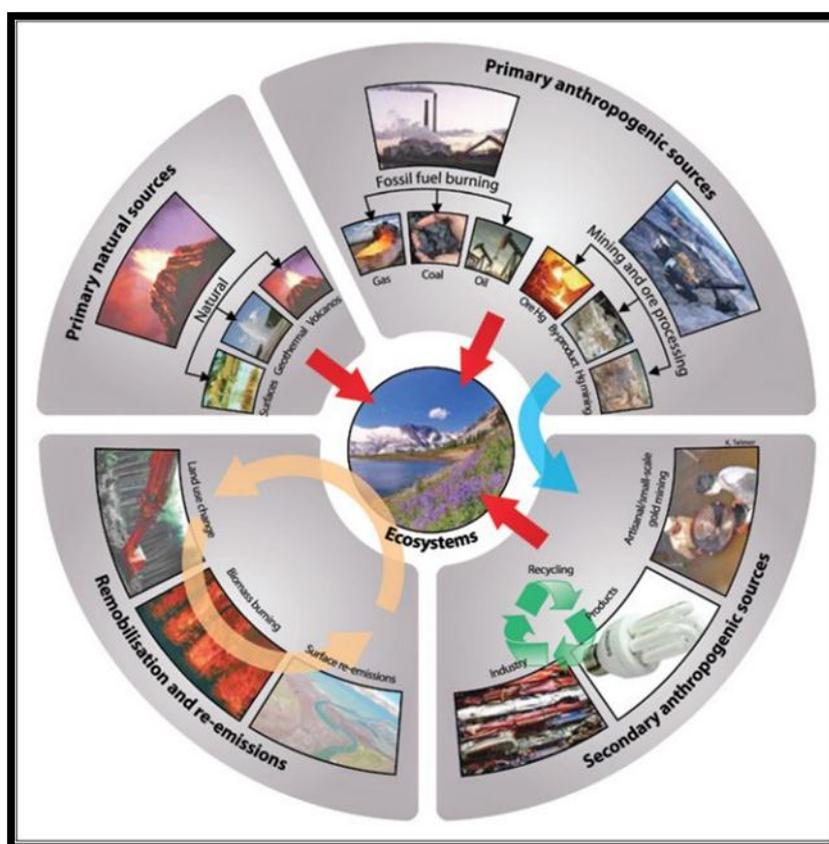


Figura 1: Tipos de emissões de mercúrio existentes ^[1].

A origem natural deste metal inclui a desgaseificação da água e da terra, emissões biogênicas de compostos voláteis e de partículas e o arrastamento de partículas de poeira pelo vento, por exemplo de locais onde ocorreram erupções vulcânicas. Emissões de zonas aquáticas e incêndios florestais, além de serem emissões naturais, são também consideradas fontes de remobilização do mercúrio^[1].

Apesar de diferenciados estes tipos de fontes de mercúrio, o uso antropogénico excessivo de Hg é o grande responsável pela elevada contaminação ambiental, da terra, do ar, da água e da vida selvagem, nos vários ecossistemas em todo mundo. Embora o uso global de Hg tenha diminuído muito nos últimos anos, o fato de este metal sofrer um ciclo no meio ambiente torna mais complicada a sua eliminação ou controlo^[2-4].

A química e especiação do mercúrio são complexas, dificultando a previsão do seu comportamento e conseqüentemente a previsão dos efeitos ecológicos e toxicológicos por ele provocados. De entre as espécies/compostos de mercúrio existentes, o mercúrio orgânico na forma de metilmercúrio é o mais tóxico, e é responsável pelos danos mais prejudiciais à saúde observados em humanos^[5]. O metilmercúrio é rapidamente absorvido pelos organismos vivos, ou seja, é bioacumulável^[2]. Este fato torna a contaminação de ambientes aquáticos por mercúrio extremamente preocupante uma vez que a bioacumulação em peixes é uma via fácil pela qual o mercúrio pode chegar aos seres humanos ou a outros organismos que se alimentam de organismos aquáticos.

1.1.1. Ciclo do mercúrio

O mercúrio possui um ciclo biogeoquímico geral, onde as diversas formas existentes podem circular entre a atmosfera, meio aquático e ambientes terrestres (Figura 2). Neste circuito o mercúrio pode estar no estado de oxidação zero, um ou dois, ou conjugado com compostos orgânicos e inorgânicos^[6]. Estas mudanças de estado de oxidação ou agregações com outros compostos são devidas não só a transformações químicas, mas também a transformações microbianas, as quais desempenham um papel importante^[4, 7-8].

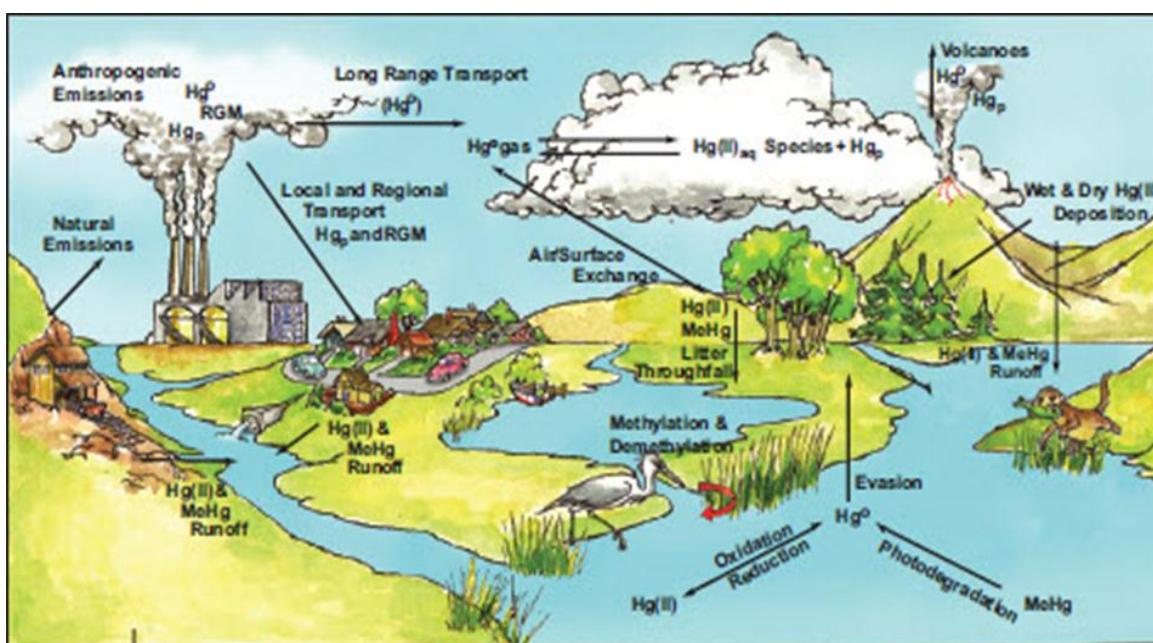


Figura 2: Ciclo biogeoquímico do mercúrio^[7].

Especificamente nos meios aquáticos, a forma química do mercúrio é fortemente influenciada pelo pH e pelo potencial de oxidação redução, bem como pelas concentrações de compostos inorgânicos e orgânicos^[4]. As principais espécies de Hg presentes em ambientes aquáticos são: mercúrio no estado de oxidação dois, Hg^{2+} , as formas de Hg orgânico, principalmente metilmercúrio (CH_3Hg), e formas gasosas de mercúrio, como Hg^0 , dimetilmercúrio ($(CH_3)_2Hg$) ou etilmercúrio (C_2H_5Hg) (Figura 3)^[4, 6, 9-10].

O que acontece neste ciclo é que normalmente águas naturais são saturadas em Hg^0 relativamente ao ar, portanto, resulta num fluxo de Hg^0 da água para a atmosfera,

por volatilização. Cerca de 95% do mercúrio atmosférico total corresponde a mercúrio elementar, Hg^0 (no estado gasoso), o qual consegue permanecer durante cerca de um ano na atmosfera. Apesar da sua elevada estabilidade, o Hg^0 acaba por ser oxidado ao estado Hg^{2+} , principalmente por meio de chuvas com Hg^{2+} dissolvido, retornando assim o mercúrio à superfície da Terra. Este Hg^{2+} acaba por ser reduzido novamente a Hg^0 , o que lhe permite retornar à atmosfera^[6-7]. O tempo que o Hg^0 permanece na atmosfera faz com que este seja distribuído ao longo de todo planeta, antes de voltar para a terra, lagos, mar e gelo. Como resultado, enquanto as principais emissões de mercúrio são provenientes de fontes pontuais concentradas em regiões industrializadas, a poluição por mercúrio é um problema à escala global^[2, 6-7, 11].

Os sedimentos de rios, lagos e oceanos poluídos com mercúrio são perigosos uma vez que o mercúrio confinado pode permanecer ativo como substrato para a metilação por vários anos, mesmo quando a fonte poluidora é eliminada. Os agentes orgânicos complexantes solúveis em água, tais como os ácidos húmicos e ácidos fúlvicos, podem quelar as espécies solúveis e insolúveis na água; os últimos precipitam-se diretamente da solução para o sedimento^[12].

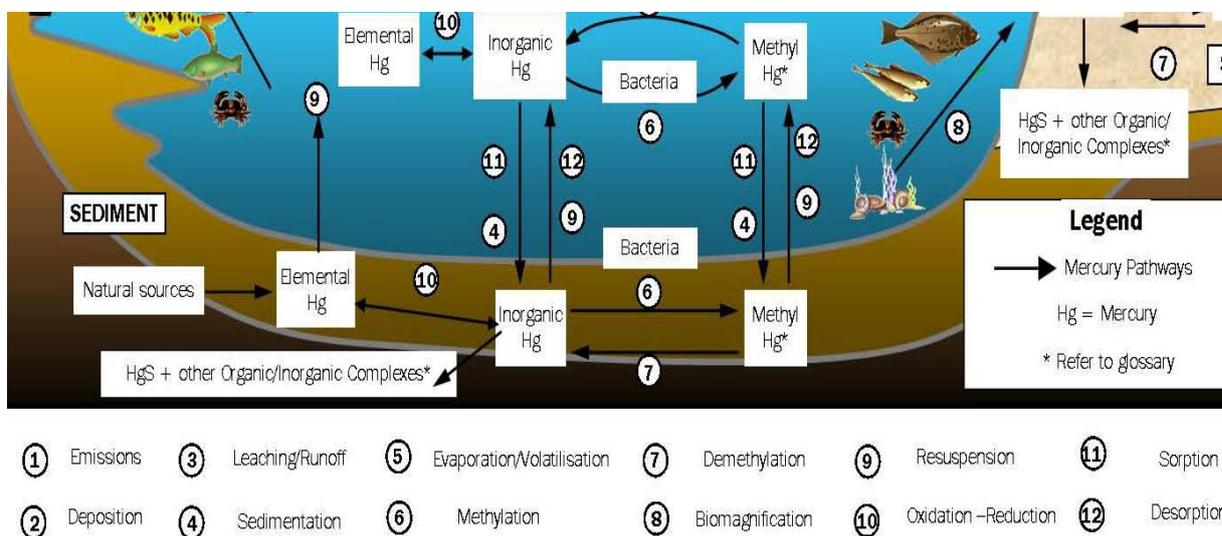


Figura 3: Ciclo global do mercúrio em ambientes aquáticos (adaptado)^[11].

A metilação de um metal, isto é, a transferência de um grupo metilo a partir de um composto orgânico para o íon metálico não é uma reação química fácil uma vez que implica a transferência de um grupo negativo alquilo. Da mesma forma, a reação de hidrólise de metilmercúrio é termodinamicamente favorável, mas cineticamente impedida, e o metilmercúrio permanece estável em solução aquosa.

A reação de metilação ocorre em solos, águas e sedimentos. O último tem recebido uma atenção especial, devido à formação de metilmercúrio ter sido primeiramente demonstrada em sedimentos e a metilação ser mais intensa que em outros sítios, no ambiente aquático^[13]. O solo geralmente também tem condições favoráveis à formação de compostos de mercúrio inorgânicos (como Hg(OH) e HgCl) e o cátion mercúrio pode originar complexos com aniões orgânicos. O fato de o mercúrio se acoplar fortemente com carbono presente nestes ambientes, leva ao seu armazenamento, e logo a um grande controle da sua mobilidade. Estas ligações a compostos orgânicos tornam-nos suscetíveis de serem carregados pela água somente quando ligados a sólidos em suspensão ou a húmus. Por estas razões o mercúrio tem um grande tempo de retenção no sedimento e, como resultado, o mercúrio acumulado no sedimento pode ser continuamente libertado para a água por longos períodos de tempo, possivelmente cem anos. A acumulação do mercúrio no solo/sedimento ocorre somente no horizonte superficial rico em matéria orgânica, assim os solos orgânicos têm conteúdos de Hg geralmente mais altos que solos minerais^[12].

As reações de metilação/desmetilação resultam de processos fotoquímicos ou precisam ser catalisadas por microrganismos^[6-7, 14]. Não menosprezando os processos fotoquímicos, os microrganismos são essenciais para os mecanismos de metilação e desmetilação. Há inclusive autores que consideram a existência de um pequeno ciclo do mercúrio nos sedimentos devido a estas transformações contínuas^[1]. O processo de desmetilação, principalmente de metilmercúrio e dimetilmercúrio, é muito importante para diminuir a toxicidade em ambientes aquáticos. Por essa razão, a libertação de Hg²⁺ destas reações e sua consequente redução é uma forma de manter o mercúrio no seu estado menos reativo e prejudicial para o homem.

1.1.2. Exemplo de ambientes contaminados com mercúrio

Contaminações com mercúrio não são incomuns e sucederam em vários países como consequência de uma variedade de desperdícios da atividade humana. Segue-se uma breve descrição de alguns exemplos desta contaminação a nível mundial.

O primeiro exemplo é um caso no Golfo de Trieste (norte do Adriático), onde a principal fonte de poluição por mercúrio foi uma mina de mercúrio antiga, situada junto ao rio Soca. Este transporta e dissipa o metal por todo o percurso que faz até desaguar no mar. Neste caso, os ecossistemas contaminados ao longo do seu percurso ficam bastante afetados^[4, 15].

Na baía de Minamata, Japão, a contaminação com metilmercúrio por uma fábrica causou uma catástrofe ambiental na década de 50. Algum mercúrio foi transportado da Baía de Minamata para o mar Yatsushiro, fato preocupante uma vez que a pesca é uma atividade importante desse mar e a bioacumulação de mercúrio nos peixes pode ocorrer^[4, 16].

Na Amazónia, desde a década de setenta, várias técnicas de extração de ouro, utilizando amalgamação com mercúrio, têm sido efetuadas. O mercúrio lançado no ecossistema aquático, proveniente das atividades minerais é considerado um importante fator para a contaminação deste ecossistema. Estudos conduzidos na região do rio Tapajós, considerado o maior afluente do rio Amazonas, demonstraram que o mercúrio está presente em todos os compartimentos do meio ambiente^[17-18].

Na década de 70, no Iraque, Paquistão, Gana e Guatemala ocorreram vários casos de contaminação. As populações utilizavam, na confeção de pão caseiro, grãos de cereais tratados com fungicidas à base de metil e etilmercúrio. Particularmente no Iraque foram registadas 459 mortes por intoxicação com mercúrio^[19].

Por fim, é apresentado um caso português. Em Aveiro, mais especificamente no Complexo Químico de Estarreja, uma fábrica produziu soda cáustica e cloro, recorrendo a células de mercúrio entre 1950 e 1994. O resultado da elevada utilização de mercúrio levou à sua descarga numa área limitada da Ria de Aveiro denominada Baía do Laranjo, que é uma das áreas mais contaminadas com mercúrio em Portugal. No ano de 2002 a produção destes compostos por este método foi encerrada, no entanto a transformação

do mercúrio, ainda presente nos ecossistemas, em metilmercúrio, pode levar a que ocorra bioacumulação, tornando preocupante o consumo de peixe proveniente deste local^[20-21].

1.1.3. Sapais

Os sistemas estuarinos são zonas de transição entre rios e o mar onde a ação das marés e a erosão permitem o estabelecimento de vegetação. Um dos mais importantes ecossistemas que integra os sistemas estuarinos é o sapal, que tem grande importância económica e ambiental^[22]. Além de representarem importantes fontes de nutrientes, os sapais desempenham igualmente um papel decisivo na preservação da costa, no processo de inundação. O processo de formação do sapal inicia-se com o assentamento da vegetação pioneira perto do nível médio-alto das marés, onde as sementes de plantas são capazes de germinar. Assim que as plantas se começam a instalar, a deposição de sedimentos aumenta desencadeando o processo de desenvolvimento do sapal, incluindo a formação dos riachos que desempenham um papel importante no aporte de sedimentos e estimulação do crescimento de espécies^[23]. Apesar de todos estes fatores benéficos que potenciam o aparecimento de vegetação, as condições físico-químicas dos sapais são adversas relativamente à nutrição, crescimento e reprodução da maioria das plantas vasculares, limitando assim o número das espécies capazes de suportar estas condições ambientais. Com efeito, os sapais são colonizados por um reduzido número de espécies, pertencentes a poucos géneros, com características bem adaptadas ao habitat particular em que se desenvolvem^[22, 24].

O interesse dos sapais é amplamente reconhecido, uma vez que estes desempenham papéis importantes na reciclagem de metais em ecossistemas costeiros. Estes podem atuar como fonte, escoamento ou transformação de produtos químicos industriais e agrícolas, originando um aumento das concentrações de metais nos sedimentos. No entanto, podem ainda ser fontes de matéria orgânica e nutrientes, apoiando as cadeias alimentares, como já foi referido. Os problemas surgem quando os sapais funcionam como fontes de exportação de metais para os ambientes adjacentes. Os sistemas estuarinos produzem mais material do que o que pode ser degradado ou

armazenado nos sistemas, e logo tudo que seja excesso é exportado para as zonas próximas^[10, 21].

Nos sapais, a disponibilidade do mercúrio para as plantas está dependente de diversos fatores, nomeadamente de características físico-químicas dos sedimentos, como granulometria das partículas, temperatura, a dissolução/precipitação e especiação metálica e também de características inerentes às próprias plantas^[22, 24]. Contudo, fatores como o pH, o potencial redox, o conteúdo em matéria orgânica e a salinidade são os fatores com maior influência na biodisponibilidade dos metais nos sedimentos^[22, 24]. Valores baixos de potencial redox implicam uma maior ligação dos metais aos sulfuretos nos sedimentos, ficando assim imobilizados^[24]. O potencial redox do sedimento entre as raízes é normalmente mais elevado do que no sedimento sem raízes, o que pode ser devido à libertação de oxigénio por parte destas^[25]. Baixos valores de pH aumentam a biodisponibilidade dos metais, devido à grande afinidade dos iões hidrogénio os coloides que são negativamente carregados, havendo assim competição com os iões metálicos. O aumento da mobilidade do mercúrio associado à matéria orgânica ocorre quando os sedimentos estão inundados. Apesar de todos estes fatores, os sedimentos de sapal são considerados simultaneamente acumuladores e libertadores de mercúrio.

1.2. *Halimione portulacoides*

As plantas de sapal possuem determinadas características que lhes permitem sobreviver em condições adversas como as identificadas nos sapais. Algumas dessas características são bem conhecidas, nomeadamente a redução da área foliar, aumento da suculência das folhas, caules e raízes e proteção dos órgãos aéreos por uma cutícula espessa^[24]. De entre as várias espécies caracterizadas, é salientada a *Halimione portulacoides*, uma espécie bastante abundante e amplamente estudada e utilizada pela comunidade científica^[26].

Halimione portulacoides é um pequeno arbusto verde-acinzentado (Figura 4) amplamente distribuído na Europa, Ásia temperada e zonas de África. Esta planta halófito, encontra-se em sapais e dunas costeiras, e é normalmente inundada pela maré alta. Pode crescer até aos 75cm e nos climas temperados e floresce de Julho a Setembro. É reconhecida como sendo das mais estudadas neste ambiente e desempenha um papel importante nos sapais^[26].

A rizosfera de *H. portulacoides* tem uma densa comunidade bacteriana uma vez que este micro-habitat especial onde a planta se desenvolve parece atender às exigências em termos de disponibilidade de compostos orgânicos lábeis^[27]. Sedimentos colonizados por esta planta da Ria de Aveiro são mais ricos em partículas finas e em nutrientes orgânicos, ou seja, azoto e fósforo, que a área não vegetada^[28].



Figura 4: *Halimione portulacoides*.

1.2.1. *Halimione portulacoides* e relação com o mercúrio

Para sobreviverem em sapais contaminados com metais, as plantas são capazes de desenvolver mecanismos de regulação, de acordo com sua capacidade de tolerância^[29].

As plantas diferem na sua habilidade em retirar, acumular e tolerar metais pesados, podendo ocorrer diferenças relevantes entre as espécies, entre variedades de uma mesma espécie e também entre tecidos da mesma planta^[30-31].

Sabe-se que as plantas desenvolveram três estratégias básicas para crescerem em locais contaminados. São elas: plantas que excluem os metais (impedem acumulação), plantas indicadoras de metal (acumulam metais nos tecidos conforme as concentrações a que são expostas) e plantas acumuladoras de metal (hiperacumuladoras de metais em todos os tecidos da planta)^[24]. Desta forma é possível restringir o acesso de metais pesados livres aos compartimentos celulares, protegendo o normal funcionamento das células e logo da planta.

Nos casos em que as plantas se defendem tolerando os metais, podem fazê-lo através de dois mecanismos: o mecanismo de restrição metálica e o mecanismo de tolerância intracelular. Já os mecanismos intracelulares de tolerância podem por sua vez dividir-se também em dois grupos, um em que há indução do sistema antioxidante e outro onde há indução de compostos quelantes no metal. Os metais podem ser acumulados tanto na parede, como no citoplasma ou em vacúolos das células^[32].

A retenção intracelular de metais é um mecanismo eficaz para minimizar consequentes efeitos tóxicos nas plantas, sendo os agentes quelantes de metais, por exemplo ácidos orgânicos e aminoácidos, moléculas importantes. Nesse contexto, alguns trabalhos mostraram que o mercúrio pode induzir a produção de péptidos específicos, denominados fitoquelatinas^[24, 33]. As fitoquelatinas são pequenos polipéptidos de ligação aos metais, produzidos enzimaticamente a partir da glutatona, e que reduzem os danos provocados pelo mercúrio ao nível dos processos metabólicos^[34]. Quando na presença de elevadas concentrações de metais tóxicos, as fitoquelatinas são rapidamente induzidas, captando e inativando os íons metálicos que entram no citosol antes que estes possam inativar enzimas de vias metabólicas essenciais^[24, 30]. Apresentando um exemplo, o mercúrio tem uma alta afinidade para grupos sulfidril e, consequentemente pode

perturbar as funções celulares^[35]. Estas funções celulares são mediadas por proteínas com grupos sulfidril. Se estas proteínas forem essenciais e não-protegidas, a presença do mercúrio pode afetar grandemente a sobrevivência celular^[35-36]. As fitoquelatinas constituem o mecanismo de tolerância a metais mais conhecido nas plantas.

Considerando a capacidade das plantas de sapal de acumularem altas concentrações de mercúrio, como é o caso da *H. portulacoides*, o seu emprego em processos de fitorremediação poderá ser uma boa estratégia para remover o mercúrio de zonas contaminadas^[37-38].

1.2.2. Importância da utilização da planta *Halimione portulacoides*

A acumulação de mercúrio em plantas difere de acordo com o órgão da planta analisado e com as concentrações de mercúrio nos sedimentos. *H. portulacoides* é considerada um bioindicador de ambientes contaminados com mercúrio no entanto pode também ser usada como um biomonitor^[31]. Um bioindicador é um organismo, um grupo de organismos ou partes de organismos, que fornecem informações qualitativas sobre a qualidade do ambiente que os rodeia, enquanto um biomonitor consegue quantificar a qualidade do seu ambiente^[39].

Macrófitas aquáticas têm sido sugeridas como bioindicadores de contaminações de metais em regiões costeiras^[40]. Um bom candidato a um biomonitor deve obedecer a um determinado conjunto de características, tais como ter uma ampla distribuição geográfica, não deve ser sazonal e deve ter alguma longevidade. As plantas devem ter tecido suficiente para analisar e de fácil medição de contaminantes nos seus tecidos sem risco de sair dos limites de deteção^[31]. A grande diferença entre este tipo de análise e análises físico-químicas das zonas contaminadas é que as últimas podem fornecer informações detalhadas sobre as espécies metálicas e níveis de contaminação do ecossistema, enquanto os estudos de biomonitorização podem ir mais longe, dando informações sobre os níveis de bioacumulação, de integração e os efeitos toxicológicos^[41].

A utilização de biomonitores no campo tem várias vantagens pois a biodisponibilidade dos contaminantes é altamente dependente das condições ambientais onde os fatores abióticos e bióticos estão integrados. A utilização destas estratégias inovadoras e de plantas com características como as da planta *Halimione portulacoides* podem futuramente vir a ser uma ferramenta importante na identificação de potenciais riscos para a saúde do Homem^[31, 42].

1.3. Comunidades microbianas e o mercúrio

Grandes contaminações com metais reduzem a abundância e a diversidade das populações nas comunidades microbianas, e conseqüentemente interferem nos processos microbiológicos do solo^[43]. A troca de espécies inorgânicas para as formas orgânicas é o primeiro passo para os processos da bioacumulação do mercúrio na biota. Considera-se que estes processos ocorrem tanto na coluna de água quanto no sedimento^[12].

A principal transformação microbiana que envolve o mercúrio é a metilação/desmetilação. No entanto, mesmo após 30 anos de estudos do ciclo biogeoquímico do mercúrio há ainda questões por responder acerca deste processo. A biossíntese pode ocorrer nos sedimentos, na coluna de água e pensa-se que também no interior dos organismos. Não é, no entanto, claro se se trata de uma síntese enzimática ou apenas de uma reação química com a metilcobalamina, mais comumente designada de vitamina B₁₂^[44]. A metilação requer a transferência de um anião alquilo (como o CH₃), que é uma base forte e instável em meio aquoso. Como tal, a metilação só ocorre como resultado de um processo fotoquímico ou então necessita de ser catalisada por microrganismos^[45]

A metilação do mercúrio ocorre tanto em condições aeróbias como em condições anaeróbias, no entanto, as maiores taxas de metilação ocorrem em condições não oxigenadas^[46]. A microbiota associada a ambientes redutores (ambientes com pouca disponibilidade de O₂ ou alta de H₂, necessário para que haja a formação de ligações C-H) e com baixa concentração de sulfuretos parece ser mais apta a converter o mercúrio inorgânico em metilmercúrio^[47].

Elevadas taxas de metilação foram relacionadas com a abundância de bactérias redutoras de sulfato em alguns sedimentos, tendo depois sido caracterizadas como os principais agentes metiladores em amostras de sedimentos anóxicos^[48]. Geralmente, a eficiência da produção de metilmercúrio por bactérias está relacionada com a disponibilidade de mercúrio e nutrientes, abundância de aceitadores de elétrões, taxas de redução de sulfato, composição da comunidade microbiana, distribuição das populações de bactérias redutoras de sulfato e atividade bacteriana^[19].

A produção de metilmercúrio é maior nos primeiros dias ou semanas após a entrada do mercúrio no meio ambiente e após essa fase inicial, a produção pode decrescer ou apresentar um padrão cíclico^[19]. A entrada do Hg na célula bacteriana dá-se por difusão simples de espécies neutras. Acredita-se serem as principais moléculas que entram nas células, uma vez que a carga dificulta a passagem através da bicamada lipídica. A difusão passiva de complexos de cloreto de mercúrio, HgCl_2 , neutro, ocorre em ambientes aeróbios, e as estimativas da formação constante para HgS^0 neutro, indicam que esta é a espécie de mercúrio mais absorvida pelas células, em concentrações de sulfureto baixas^[49].

Em águas naturais o principal responsável pela metilação do mercúrio é a bactéria sulfato-redutora *Desulfovibrio desulfiricans*, enzimaticamente mediada pela presença da metilcobalamina^[45].

1.3.1. Influência das comunidades na descontaminação

Os microrganismos podem desempenhar um papel importante no ciclo biogeoquímico dos metais tóxicos. Considerando a importante participação das bactérias no ciclo ambiental do Hg, a grande diversidade genética apresentada por estes organismos e a ausência de informações sobre estes processos em isolados bacterianos, houve a necessidade de realizar estudos bioquímicos e genéticos sobre a resistência de bactérias ao Hg^[44].

O uso de microrganismos capazes de metabolizar substâncias tóxicas presentes no ambiente e de transformá-las numa forma cujo potencial de dano a saúde humana ou à fauna e flora seja reduzido é um ponto crucial em trabalhos deste tipo^[44].

É importante compreender como as populações microbianas respondem às elevadas concentrações metálicas e as respostas normalmente estão relacionadas com alguns processos biológicos importantes no solo^[50].

1.3.2. Mecanismos de resistência

Em resposta à toxicidade dos compostos de mercúrio globalmente distribuídos, os microrganismos desenvolveram mecanismos de resistência para sobreviverem neste tipo de ambientes^[51].

As primeiras questões relativamente à resistência bacteriana a metais surgiram na década de 60^[52]. Mais especificamente, a resistência ao Hg em bactérias tem sido intensamente investigada e estão descritos dois tipos de mecanismos de resistência mediados por enzimas: a resistência de espectro limitado e a resistência de espectro amplo. A resistência de espectro limitado envolve a redução de Hg^{2+} a Hg^0 e a resistência de espectro amplo é bastante permissiva a compostos de Hg e inclui a transformação redutiva (envolvendo hidrólise e destoxificação) de organomercuriais, entre eles o metilmercúrio^[53]. Ambos os tipos de resistência têm por base o chamado, operação *mer*.

O operão *mer* normalmente encontra-se inserido em plasmídeos, transposões ou mesmo nos cromossomas^[44, 52-53]. Este é considerado o melhor mecanismo descrito e difundido de resistência bacteriana, bem como em linhagens de *Archaea*. A reação é catalisada por produtos do operão *mer* Figura 5, que codifica um grupo de proteínas envolvidas na regulação, transporte e redução de Hg^{2+} ^[54-55].

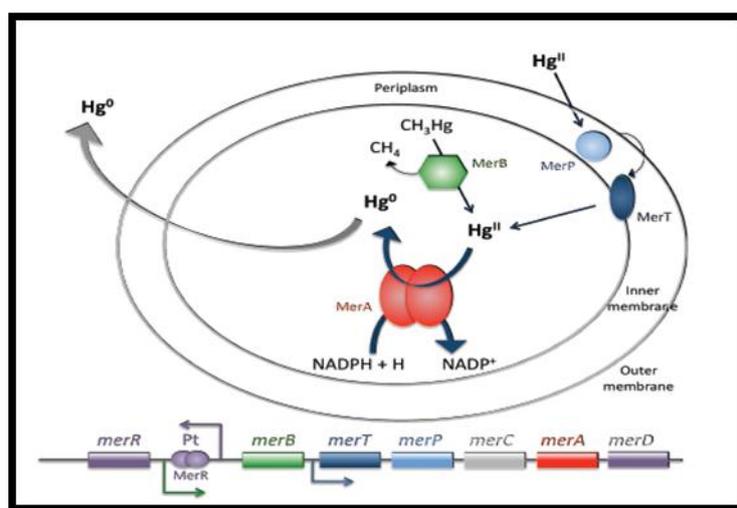


Figura 5: Operão *mer*. Figura ilustrativa do mecanismo de metilação do mercúrio^[56].

De entre todos os genes constituintes deste operão, o gene *merR* é aquele que tem a função de regulação, reprimindo ou ativando a região promotora/operadora. Os demais são genes estruturais *merT*, *merP*, *merA*^[56].

O *merR* é o gene que codifica a proteína citoplasmática que controla a transcrição dos genes estruturais positivamente ou negativamente. O seu produto foi identificado como um dímero de 15,9 kDa com cerca de 144 resíduos de aminoácidos^[57]. Em alguns operões *mer* é encontrado também o gene *merD*, que parece reprimir a expressão do operão. Um outro gene que eventualmente tem sido encontrado é o *merE*, que parece ter uma função no transporte do Hg para dentro do citoplasma da célula^[44, 57]. O gene *merT* codifica um polipeptídeo hidrofóbico de aproximadamente 12,4 kDa contendo 116 resíduos de aminoácidos e as suas propriedades físicas sugerem que seja uma proteína de membrana a qual é consistente com a sua função de transportar Hg²⁺ da membrana interna da célula para o citoplasma da bactéria como mostra a figura^[57].

Um outro gene, o *merP*, está aparentemente envolvido no transporte do mercúrio do periplasma para a membrana interna da célula bacteriana. Este é uma proteína que provavelmente se localiza no espaço periplasmático e tem tamanho aproximado de 9,4 kDa com cerca de 91 resíduos de aminoácidos^[44, 57]. O produto do gene *merC* parece estar associado com a membrana externa e no transporte do Hg. O gene *merA* codifica a enzima mercúrio redutase responsável pela conversão do Hg²⁺ a Hg⁰ e encontra-se no citoplasma^[57].

Os genes acima referidos, *merT*, *merP*, *merC*, *merA* e *merD* estão envolvidos na resistência de espectro limitado. Para as bactérias que apresentam resistência de espectro amplo, o operão *mer* é adicionalmente constituído com um sexto gene, o *merB* que codifica a enzima liase-organomercurial, uma proteína citoplasmática que promove a quebra da ligação carbono-mercúrio dos compostos organomercuriais. Deste modo, nas bactérias que possuem resistência ao Hg de espectro amplo, o mecanismo de resistência envolve a participação direta tanto do produto do gene *merA*, quanto do *merB*^[44, 58].

O mecanismo de resistência de espectro amplo ocorre aquando da entrada do ião mercúrico (Hg²⁺) no espaço periplasmático e se liga à proteína MerP, libertando dois prótons. Esta ligação impede que o ião afete grupos sulfidrilo de proteínas no espaço

periplasmático e na superfície da membrana citoplasmática^[57]. Em seguida, o íon Hg^{2+} é transferido da proteína MerP no periplasma para a proteína MerT já na membrana interna por um mecanismo de oxidação-redução. A partir da membrana interna o íon Hg^{2+} é transferido para o citoplasma onde é reduzido a Hg^0 pelo produto do gene *merA* através de uma reação dependente de NADPH. Desta forma é libertado no citoplasma e sai da célula por difusão simples devido sua solubilidade lipídica e pela pressão de vapor elevada^[59].

Em relação aos compostos organomercuriais (CH_3Hg e $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$), o seu transporte da superfície celular até ao citoplasma ocorre através do mesmo mecanismo já descrito anteriormente. Uma vez no citoplasma, o composto organomercurial, por ação do produto gene *merB*, sofre clivagem na ligação carbono-mercúrio, reduzindo a Hg^{2+} que é novamente reduzido pelo produto do gene *merA* (mercúrio redutase) à sua forma elementar (Hg^0) e libertado para fora da célula tal como descrito anteriormente^[44, 59]. O funcionamento deste operação pode ocorrer sob condições aeróbicas ou anaeróbicas^[48].

1.3.3. Exemplos de microrganismos resistentes ao mercúrio

Um dos primeiros relatos referentes a microrganismos resistentes ao mercúrio, mais especificamente a sais de mercúrio, foi feito por Moore (1960), que investigou estirpes clínicas de *Staphylococcus aureus*. Este estudo foi despoletado devido ao uso indiscriminado de compostos de mercúrio como desinfetantes e fungicidas em hospitais ou na comunidade^[44, 60]. Ainda na mesma década, foi realizado um trabalho em amostras ambientais por um grupo de investigadores do Japão. Estes isolaram bactérias do solo e testaram a sua resistência a diferentes compostos organomercuriais. Em seguida, e após uma identificação bioquímica, foram caracterizados como pertencentes ao género *Pseudomonas*^[44, 61].

Mais tarde, Jaques Ravel *et al* (1997) isolou duas estirpes de actinomicetos de sedimentos contaminados com mercúrio provenientes de Baltimore Inner Harbor. Estas foram depois classificadas como sendo *Streptomyces* e caracterizadas como resistentes a cloreto de mercúrio e acetato de fenilmercúrio^[62]. A resistência destes microrganismos a metais não tem sido investigada exaustivamente apesar do fato dos actinomicetos serem muito versáteis quer a nível metabólico, quer a nível biossintético. Por estas razões, são muito importantes na biotecnologia e têm sido empregues em biorremediação, incluindo recuperação de metais^[62].

Na China, na zona de Hunan Zhuzhou Smelter foram produzidas ligas metálicas durante mais de 50 anos e o solo ao redor ficou seriamente poluído. A concentração média de mercúrio nestes solos é de 3,29 mg/Kg. Após todo o procedimento, uma estirpe foi isolada e tolerava 60 mg/L de mercúrio. Era uma estirpe de Gram-negativo e em forma de bastonete. O alinhamento da sequência do gene do RNA 16S em bases de dados mostrou uma homologia de mais de 99% com *Pseudomonas aeruginosa*. A árvore filogenética baseada no gene do RNA 16S foi construída para determinar a relação entre a estirpe encontrada e outra *P. aeruginosa*. Com base nesta comparação, esta estirpe foi identificada como *P. aeruginosa*^[63].

Casos de resistência a mercúrio em sedimentos foram encontrados por Radford *et al.* (1981), tendo sido identificada a existência da espécie *Pseudomonas fluorescens*, enquanto Nakamura *et al.* (1990) mostrou que 4,5% das bactérias isoladas de sedimentos

contaminados com mercúrio exibiam resistência de espectro amplo, em comparação com apenas 1,1% de um local controle^[64-66].

De locais contaminados com mercúrio como East Fork Poplar Creek no Tennessee; Davis Creek Reservoir na Califórnia e Little Rock Lake em Wisconsin foram amostrados água e sedimento. Concluiu-se que o sedimento dos dois primeiros continha uma elevada diversidade bacteriana. Rochelle *et al* (1991) identificaram *Bacillus* e *Acinetobacter calcoaceticus*^[65].

Mais tarde, algumas estirpes bacterianas resistentes ao mercúrio foram isoladas de amostras de água e sedimentos marinhos por Jaysankar *et al* (2007)^[67]. Por sequenciação do rDNA 16S, os isolados bacterianos foram identificados como pertencentes aos géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Brevibacterium* e *Bacillus*. Na Tabela 1 encontra-se informação relativa a estes isolados, nomeadamente à identificação e respetiva percentagem de homologia quando feita a submissão na base de dados^[67].

Tabela 1: Estirpes bacterianas identificadas a partir do rDNA 16S, de amostras de água e sedimentos contaminados com mercúrio^[66].

Code	Sequence match (%) - forward strand	Sequence match (%) - reverse strand	Identity on the basis of 16S rDNA sequences
GO02	99.59	100	<i>Alcaligenes faecalis</i>
GP06	99.58	99.78	<i>Alcaligenes faecalis</i>
GP08	100	99.74	<i>Bacillus pumilus</i>
GP13	98.54	99.02	<i>Brevibacterium iodinium</i>
GP14	98.94	100	<i>Alcaligenes faecalis</i>
GP15	99.56	99.79	<i>Alcaligenes faecalis</i>
GP16	99.65	100	<i>Alcaligenes faecalis</i>
GP17	99.56	100	<i>Alcaligenes faecalis</i>
CH07	100	100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CH13	100	99.75	<i>Bacillus pumilus</i>
CM10	96.08	99.48	<i>Bacillus</i> sp.
S3	99.77	99.77	<i>Bacillus pumilus</i>
GO01	100	100	<i>Alcaligenes faecalis</i>

O mecanismo de resistência descrito anteriormente tem sido demonstrado num grupo diversificado de microrganismos, incluindo bactérias entéricas, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, espécies de *Bacillus*, *Thiobacillus ferrooxidans*, e *Mycobacterium scrofulaceum*. A preparação de sondas de DNA para detecção de genes de resistência ao mercúrio em bactérias de Gram negativo tem sido uma metodologia cada vez mais utilizada^[58].

Como demonstrado, as bactérias parecem ter um papel essencial na transformação do mercúrio e muitos microrganismos têm sido identificados como capazes de produzir metilmercúrio. Esta metilação, inclusivamente nos sedimentos, sabe-se agora que está relacionada com a presença e atividade das bactérias específicas, as bactérias redutoras de sulfato (SRB). As SRB são um grupo de bactérias complexo, já com muitos anos e bastante heterogéneo^[68]. Devido à sua importância para o funcionamento do ecossistema e remediação ambiental, o interesse nas SRB tem vindo a aumentar ao longo dos últimos anos. Com o desenvolvimento de técnicas de *fingerprinting*, recorrendo ao rDNA 16S, avanços notáveis foram feitos na taxonomia e filogenia deste grupo muito diversificado^[69]. A sua principal característica é a capacidade em utilizar unicamente o sulfato como aceitador final de eletrões na respiração anaeróbia. A implicação inicial das SRB na metilação foi baseada na demonstração de que o inibidor específico da metanogénese, bromoetano sulfónico, estimulava o processo, enquanto a presença de molibdato, o inibidor específico da redução do sulfato, aboliu a metilação em sedimentos de sapais^[70]. Estas observações foram posteriormente confirmadas e expandidas para águas doces e sedimentos estuarinos onde várias estirpes de SRB foram isoladas e usadas em estudos acerca da metilação de mercúrio^[68, 71]. As SRB não existem em locais restritos mas são sim distribuídas de uma forma global, tendo sido encontradas já em todos os continentes. Podem viver em vários tipos de ambientes e não estão limitadas pelo oxigénio como antes se pensava. Inicialmente pensava-se que as SRB necessitavam de oxigénio e de sulfato para sobreviverem, o que não é verdade. Estudos mais recentes sugerem que a atividade das SRB também é detetada em sedimentos de água corrente e outros ambientes com baixa concentração em oxigénio. Estudos de microambientes novos, onde a metilação do mercúrio é observada, mostram um variado tipo de novas

bactérias que desempenham um papel importante na metilação. De fato, já há alguns estudos que sugerem que além das SRB, há outros microrganismos responsáveis pelos processos de metilação^[68].

Embora existam SRB em pelo menos quatro filos no domínio *Bacteria*, a melhor caracterização de SRB que exercem metilação do mercúrio corresponde a membros do filo *Proteobacteria*, das famílias *Desulfovibrionaceae*, *Desulfobacteriaceae* e *Desulfobulbaceae*^[56, 72-73]. Apesar destas bactérias serem predominantemente anaeróbias, estudos recentes demonstraram que muitas delas são tolerantes ao oxigênio, o que pode facilitar a metilação do mercúrio em ambientes aeróbios junto a macrófitas^[73]. Investigações iniciais, como nos exemplos apresentados, relacionam a capacidade da metilação do mercúrio de outras bactérias como *Enterobater aerogenes*, *Clostridium cochlearium*, e *Methanogenic bacterium*, servindo este mecanismo de uma via de resistência para tolerar o mercúrio inorgânico^[73-74]. O gênero *Desulfovibrio* (família *Desulfovibrionaceae*), (Figura 6) pertencente ao grupo das bactérias sulfato redutoras de Gram negativo, tem sido muito utilizado nos estudos de metilação do mercúrio^[75]. No entanto, outros membros deste grupo têm a capacidade de metilar o mercúrio, tais como os pertencentes à família *Desulfobacteriaceae*, que apresentaram uma maior eficiência para metilar o Hg que os indivíduos do gênero *Desulfovibrio*^[76], assim como os indivíduos do gênero *Desulfobacter* (família *Desulfobacteriaceae*), que possuem uma maior abundância nos sedimentos que os do gênero *Desulfovibrio*^[19].

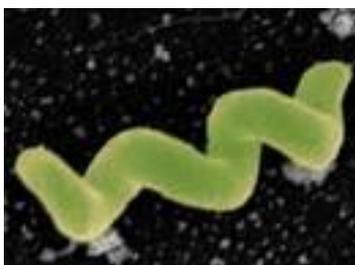


Figura 6: *Desulfovibrio vulgaris*, um exemplo de uma SRB importante na metilação do mercúrio^[73].

Atualmente, sabe-se também que bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* aparentemente não têm a capacidade de metilação enquanto *Desulfovibrio desulfuricans*, *Selenomonas ruminantum* e *Megasphera elsdenii* são capazes de desmetilar o metilmercúrio^[73].

Experiências mais recentes *in vitro* e *in situ* demonstraram que bactérias metanogénicas e acetanogénicas não contribuem significativamente para a produção de metilmercúrio nos sedimentos. Emergiu um consenso de que as SRB são os metiladores de mercúrio mais importantes em sedimentos marinhos^[73].

Cada um destes grupos filogeneticamente distintos pode ter diferentes potenciais de metilação de mercúrio. Este problema torna-se mais complexo se a relação entre a taxa de metilação de mercúrio e da taxa de redução de sulfato, os quais são considerados processos enzimáticos que respondem às variáveis ambientais, for diferente para cada grupo SRB^[71].

O estudo da diversidade bacteriana é essencial para aprofundar o entendimento da biogeoquímica do mercúrio, mas deixa algumas perguntas sem resposta. As bactérias cultiváveis representam uma fração muito pequena da diversidade microbiana observada no ambiente e os ensaios de metilação são relativamente demorados. Por outro lado, se for mostrado que um determinado gene funcional está envolvido na metilação do mercúrio, a distribuição desse gene na comunidade microbiana poderá expor quais as espécies capazes de efetuar metilação. A investigação de uma base genética ou bioquímica para a capacidade de metilação dos organismos é uma abordagem alternativa que pode aprofundar o que é compreendido através de estudos de filogenia^[48].

1.4.Comunidades microbianas e planta

A planta e os microrganismos, em separado parecem ser relevantes de alguma forma para o ciclo do mercúrio pelo aprisionamento ou transformação do mercúrio. Por essa razão surge a hipótese de juntá-los de forma a tentarem cumprir um papel ativo na biorremediação de sapais.

As raízes das plantas podem interagir com os sedimentos em torno do oxigênio, bombeando-o para a região da raiz através do aerênquima assim como podem acidificar a rizosfera pela exsudação de compostos orgânicos que influenciam a distribuição e disponibilidade de metais como o mercúrio^[29]. Dados de *H. portulacoides* mostram que esta parece estar ativa durante todo o ano, pois os valores do potencial de oxidação redução e pH mostram que, em geral, a rizosfera é sempre enriquecida com oxigênio. Por esta razão, poderão estar dispostas as condições para a baixa produção de metilmercúrio ou degradação deste de ambientes extremamente contaminados por vários anos. Esta possível hipótese leva à necessidade de estudar as comunidades microbianas para tentar perceber que mecanismos ocorrem nestas condições.

1.5. Aplicações Biotecnológicas dos microrganismos resistentes ao mercúrio na descontaminação e recolha do metal

Vários processos biológicos têm vindo a ser empregues em biorremediação de ambientes contaminados com mercúrio com o objetivo da recuperação de metal por um baixo custo. O uso de bactérias para a remoção de metal de ambientes contaminados é um método bastante promissor, no entanto, a adsorção passiva e os tratamentos de imobilização produzem um grande volume de agregados constituídos por mercúrio e biomassa, o que pode ser problemático. Os microrganismos presentes em ambientes contaminados desenvolveram resistência ao mercúrio e desempenham um papel importante na descontaminação natural^[51, 77].

Os sistemas de resistência bacteriana por plasmídeos e transposões, em compostos mercuriais e organomercuriais são os melhores compreendidos a nível bioquímico e molecular, e são de grande interesse uma vez que representam uma estratégia natural para a biorremediação. A biomassa bacteriana é capaz de atuar continuamente como um catalisador, sem grandes acumulações^[51].

Alguma investigação foi feita nesta área de forma a perceber melhor o que acontecia. Foram criados microcosmos monitorizados com a função de retratar as características ambientais (rios, lagos, etc.) e onde foram inseridas bactérias com resistência ao mercúrio. A redução de Hg^{2+} para Hg^0 pode atingir uma taxa de 95%, demonstrando o elevado potencial biotecnológico de redução de mercúrio pelo operão *mer*^[78]. Outros estudos descreveram redução do mercúrio por estirpes bacterianas, como *Escherichia coli*, obtidas e geneticamente melhoradas por clonagem do operão *mer*^[79-80]. Bioensaios podem complementar os métodos químicos analíticos para a deteção de mercúrio biologicamente disponível em amostras ambientais. Biossensores bacterianos foram projetados para conter um plasmídeo que carrega fusões de genes entre a região reguladora do operão *mer* (*MerR*) e genes luminescência bacteriana que quantitativamente respondem a Hg^{2+} ^[51, 81].

1.6. Estratégia e objetivos do trabalho

A estratégia deste trabalho consiste na construção de microcosmos utilizando sedimento contaminado com mercúrio proveniente da Ria de Aveiro, de forma a serem analisadas as comunidades microbianas desses sedimentos. Esta metodologia foi empregue para ultrapassar barreiras como os interferentes ambientais, de forma a normalizar as amostras e poderem ser feitas comparações mais fiáveis. A duração máxima do período de incubação dos microcosmos foi cerca de 6 meses nas condições descritas no capítulo seguinte.

A técnica de PCR-DGGE foi a ferramenta utilizada no decorrer deste trabalho. De um modo geral, este método envolve a separação de sequências individuais com rigor (tendo em conta diferentes composições nucleotídicas e diferentes propriedades de fusão) de uma mistura. O DNA extraído de amostras ambientais é amplificado com um par de *primers* (específico para grupos de organismos a investigar onde a um deles é adicionada uma cauda GC) e posteriormente as amostras de PCR são separadas por eletroforese num gradiente desnaturante (ureia:formamida). Com base no comportamento de desnaturação, diferentes sequências migram para diferentes posições, produzindo padrões de bandas diferentes, onde cada banda representa teoricamente um filótipo diferente^[82]. O gene que codifica para a subunidade 16S do RNA ribossomal tem vindo a ser o mais utilizado em estudos sistemáticos e o DGGE a técnica mais útil em *fingerprinting* genético de comunidades microbianas complexas de uma diversidade de amostras ambientais.

Assim, os objetivos foram:

- Avaliar a diversidade, equitabilidade e dinâmica de comunidades bacterianas de microcosmos com sedimentos contaminados com mercúrio.
- Analisar o efeito da planta na diversidade e dinâmica destas comunidades microbianas.

2. Material e Métodos

2.1. Descrição do problema

A Ria de Aveiro é uma lagoa costeira de baixa profundidade que se estende por 45 km ao longo da costa Ocidental de Portugal desde Ovar até Mira e é caracterizada pelos seus canais de ramificação estarem ligados ao Oceano Atlântico por um único canal (Figura 7). A Ria de Aveiro suporta uma população de 250.000 habitantes na área da bacia e o seu principal município (cidade de Aveiro) está localizado a 15 km a sul de um complexo industrial localizado em Estarreja^[28, 83]. Este complexo inclui uma fábrica de cloro e soda caustica, que fez descargas de efluentes altamente contaminados com mercúrio a partir de meados de 1950 até 1994. Resultante destas descargas, a ria de Aveiro acumulou cerca de 33 toneladas de mercúrio, estando 27 destas ainda associadas aos sedimentos do estuário^[83-86].

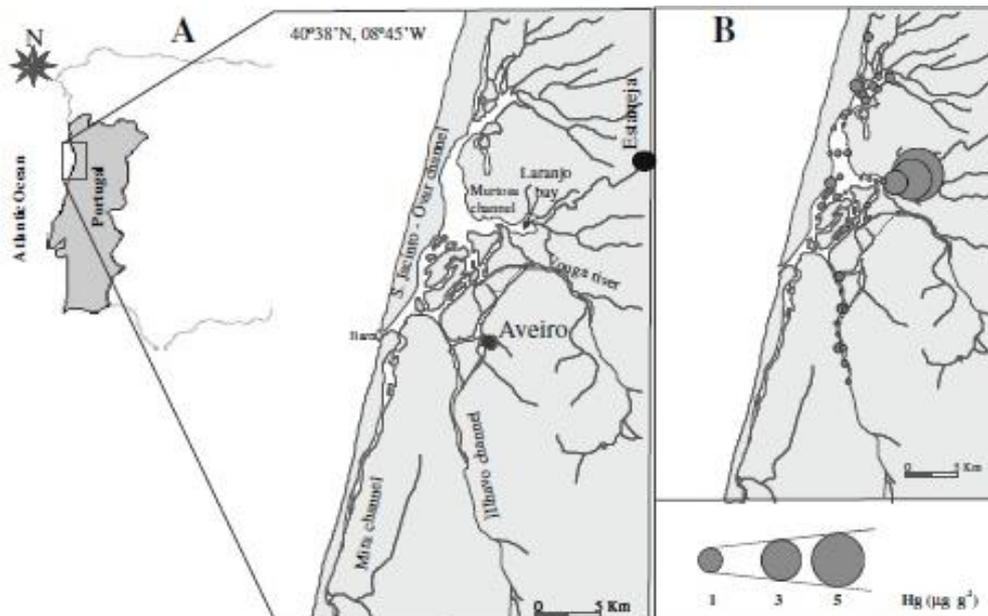


Figura 7: A: Localização da Ria de Aveiro. B: Concentração de mercúrio total ($\mu\text{g/g}$ de peso seco) em sedimentos superficiais da Ria de Aveiro^[72].

Atualmente existem preocupações acerca da saúde ambiental da Ria de Aveiro e por essa razão têm sido feitas tentativas para compreender os processos que afetam a acumulação de mercúrio, bem como o seu impacto no funcionamento dos ecossistemas^[28].

2.2. Obtenção e nomenclatura das amostras

Construíram-se microcosmos compostos por sedimento ou por sedimento e planta, utilizando sedimento proveniente da Ria de Aveiro (Baía do Laranjo).

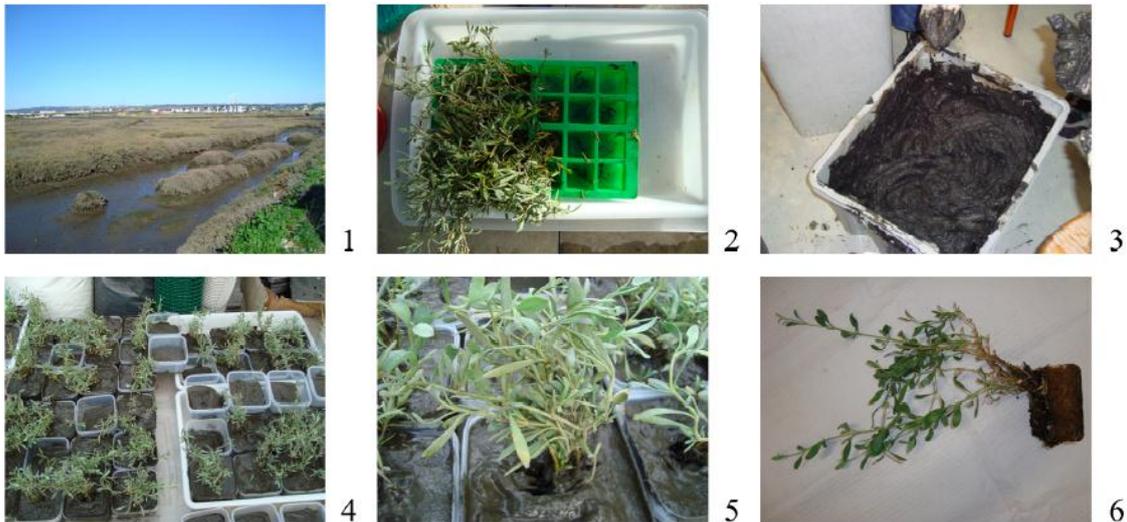


Figura 8: Representação sequencial dos passos de construção dos microcosmos. (1) Local não contaminado de recolha de sedimento e planta no estuário do Mondego; (2) Corte da planta e introdução em solução nutritiva; (3) Sedimento desprovido de macrofauna para o qual as plantas foram transferidas; (4) Aclimatização dos microcosmos sob condições controladas; (5) Transferência para sedimento proveniente da Baía do Laranjo; (6) Amostragem.

Quer a planta, *H. portulacoides* quer o sedimento inicial para aclimatização, foram recolhidos de uma zona do estuário do Rio Mondego, considerado um local de referência uma vez que não mostrava contaminação por metais em meados de Outubro de 2009 (Figura 8-1).

O procedimento de montagem destes microcosmos iniciou-se pelo corte da parte superior da planta em várias partes, as quais foram introduzidas em recipientes com solução nutritiva de Hoagland diluída para que crescessem raízes, o que aconteceu ao fim de três meses (Figura 8-2). Em Janeiro, quando as estacas mostravam sistema radicular, cada uma das plantas foi transplantada para um pote individual com sedimento previamente homogeneizado e desprovido de macrofauna (Figura 8-3). As plantas foram mantidas em estufa, sob condições controladas como, luz natural e temperatura constante (25°C) durante cerca de um mês. Potes com sedimento foram mantidos nas mesmas condições (Figura 8-4). Após este período, Planta não contaminada foi

adicionada a sedimento proveniente da Baía do Laranjo, para exposição a mercúrio inorgânico (Figura 8-5). A Figura 8-6 mostra o momento de amostragem.

No total, foram montados trinta microcosmos: quinze microcosmos com planta e quinze sem planta. Estes quinze microcosmos, de cada um dos grupos, foram divididos em três para sofrerem três tipos de condições diferentes: incubação durante um mês (tempo 0), incubação durante três meses (tempo 1) e incubação durante seis meses (tempo 2). O sedimento/rizosfera dos três tempos de exposição foi recolhido dos microcosmos correspondentes e nos tempos correspondentes. Em cada um destes três tempos foram recolhidas três réplicas de cada microcosmo.

A nomenclatura dada às amostras teve em conta o tempo de incubação, o tipo de microcosmo de onde o sedimento foi coletado e a réplica do microcosmo. Assim, amostras provindas de microcosmo com planta passaram a ser amostras P, sendo numeradas de 1 a 5. As réplicas recolhidas dos microcosmos foram denominadas por a, b ou c. Quando a análise correspondia a um microcosmo constituído apenas por sedimento as amostras foram designadas por S. Uma réplica da amostra de microcosmo 3 com planta e do tempo intermédio será nomeada de T1 P3(a), por exemplo.

2.3. Extração de DNA microbiano das amostras de sedimento

A extração de DNA das amostras de sedimento foi efetuada utilizando o kit “Ultraclean™ Soil DNA Isolation Kit” (MoBio Laboratories Inc, Carlsbad, CA EUA), segundo as recomendações do fabricante (Figura 9).



Figura 9: Transferência do sedimento recolhido dos microcosmos para tubos com *beads* provenientes do kit.

Após o procedimento de extração, o DNA foi armazenado a duas temperaturas diferentes, -20 e -80°C. A temperatura mais baixa é justificada pelo fato do DNA sofrer degradação devido à natureza da amostra, e esta ser a forma mais estável de armazenamento.

A integridade do DNA extraído foi avaliada através de gel de agarose 0,8% durante 1h20m a 80V.

2.4. Amplificação da região V3 do gene do RNA 16S:

2.4.1. Reação de PCR

A reação de PCR^[87] (*polymerase chain reaction*) tem sido aplicada à ecologia microbiana. Nesta técnica, o DNA é desnaturado para ficar em cadeia simples, emparelha com *primers* e a cadeia complementar é polimerizada pela adição de nucleótidos usando a enzima DNA polimerase. Os *primers* são escolhidos para que se liguem a regiões de interesse no DNA (perto de uma sequência alvo)^[82].

Neste estudo foi utilizada a região V3 do gene do rRNA 16S. Foi amplificada a partir de DNA total da comunidade utilizando o par de *primers* universais 338F-GC e 518R. As suas sequências são apresentadas na tabela seguinte:

Tabela 2: *Primers* universais utilizados para amplificar a região V3 do rDNA 16S a partir de DNA total de amostras de sedimento.

Denominação	Sequência (5' → 3')
Primer 338Forward	GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG
Cauda GC	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGGG
Primer 518Reverse	ATT ACC GCG GCT GCT GG

Os reagentes utilizados nas reações de PCR são comercializados pela marca *Promega* (Madison, EUA) à exceção dos d’NTPs (Fermentas, Ontario-Canadá). O volume utilizado em cada reação de PCR foi de 35µl e os seus componentes encontravam-se nas seguintes proporções:

Tabela 3: Concentrações e volumes utilizados dos componentes da mistura para o PCR.

Taq DNA Polimerase (1,25 U)	1µl
Tampão (Buffer 10X)	7µl
MgSO₄ (25nM)	3,5µl
dNTPs (10nM)	4,2µl
Primer 338F_GC (100 pmol/ µl)	1,05µl
Primer 518R (100 pmol/ µl)	1,05µl
DNA genómico (100 a 500ng)	1µl
Água	Até 35 µl

As reações decorreram num termociclador *MyCycler™ Thermal Cycler* da marca Bio Rad (EUA) de acordo com o programa seguinte:

1. Desnaturação inicial	94°C	_____	5min	} 35ciclos
2. Desnaturação	92°C		30seg	
3. Emparelhamento	55°C		30seg	
4. Extensão	72°C		30seg	
5. Extensão final	72°C	_____	10min	

2.4.2. Análise em gel de Agarose

A concentração, integridade, tamanho do fragmento amplificado e possíveis contaminações foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Consoante o tamanho dos fragmentos de DNA a separar variou-se a concentração de agarose, sendo rotineiramente utilizada a de 1,5% (p/v), exceto para a análise de DNA genómico em que se utilizou numa concentração de 0,8% (p/v). As amostras foram carregadas no gel (cerca de 1/10 do volume total) após adição de tampão de carga 6x (Tris-HCl 10 mM (pH 7.6) e

azul de bromofenol 0,03%, azul de xilenocianol 0,03%, glicerol 60%, EDTA 60 mM) que lhes confere densidade.

Para a estimativa do tamanho dos fragmentos de DNA, foi utilizado um marcador de peso molecular de DNA, o *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* da marca MBI Fermentas (Vilnius-Lithuania). A eletroforese foi conduzida a 80V durante 1hora e 20 minutos em tampão TAE 1X. No final da corrida o gel foi corado durante 15 minutos numa solução de brometo de etídeo (SIGMA, EUA) no escuro. Os fragmentos foram visualizados no Sistema de imagem Gel Doc™ XR+ System (Bio Rad -EUA) e documentados através do *software Image Lab*.

2.4.3. Condições do DGGE

O DGGE foi realizado utilizando o sistema DCode™ *Universal Mutation Detection System* (Bio Rad, EUA), tendo sido seguidas as instruções de utilização do equipamento. Os produtos de PCR com concentração de DNA semelhante entre as réplicas, (por visualização dos géis de agarose obtidos e por comparação ao marcador de peso molecular), foram aplicadas em gel de poliacrilamida 8% com tampão TAE 1x (TAE 50X: Tris base 2M, Na₂EDTA 50mM e ajustado a pH 8,0 com ácido acético glacial).

O gel de poliacrilamida (acrilamida:bis-acrilamida em proporções 37.5:1 da Bio Rad) foi feito com um gradiente de desnaturação variando de 35 a 62,5%, (para 100% de desnaturação, a ureia está presente numa concentração de 7M e a formamida de 40%). Para a polimerização das soluções desnaturantes, foram adicionados à mistura 140µl de persulfato de Amónia (Bio Rad) 10% m/v e 14µl TEMED com concentração final de 0,09% m/v.

Tabela 4: Composição das soluções desnaturantes dos géis de DGGE.

Reagentes	Solução <i>Low</i> (35%)	Solução <i>High</i> (62,5%)
TAE 50x	320µL	320µL
40% Bis-acrilamida	3,2mL	3,2mL
Formamida	2,24mL	4,0mL
Ureia	2,35g	4,2g
Água destilada	Completar até 16mL	Completar até 16mL

A quantidade de amostra aplicada no gel de poliacrilamida foi cerca de 30µl para todas as amostras às quais se adicionou 5µl de tampão de carga 6x (Tris-HCl 10 mM (pH 7.6) e azul de bromofenol 0,03%, azul de xilenocianol 0,03%, glicerol 60%, EDTA 60 mM). Juntamente com as amostras da região V3 do gene do rRNA 16S de planta e sedimento, no gel de poliacrilamida foram aplicados também marcadores. Estes tinham como função a orientação relativamente às bandas das amostras e de confirmar o gradiente do gel.

A eletroforese foi realizada a 60°C em tampão TAE 1X e o programa foi o seguinte: nos primeiros 15 minutos aplicação de 20V de voltagem e nas seguintes 16h cerca de 80V.

Após a eletroforese os géis foram colocados a corar numa solução de brometo de etídeo (0,5ug/ml), preparada na hora, durante cerca de 5 minutos, seguido de lavagem com agitação durante 20 minutos.

2.5. Análise

Os perfis de DGGE foram analisados utilizando o *software Gel Compar II* (Applied Maths, Bélgica). Foi construída uma matriz de similaridade usando o índice de Pearson. Nesta análise foram incluídas bandas com intensidade fraca e forte uma vez que é importante para comparação a presença/ausência posicional de bandas. Os dendrogramas foram construídos usando o método UPGMA.

Os padrões de DGGE foram também examinados através de dois índices, de forma a abranger múltiplos aspectos da comunidade microbiana. Para comparar a diversidade entre as diferentes réplicas e amostras, foi calculado o índice de Shannon-Weaver (H) pela seguinte fórmula $H = -\sum(pi) (\log_2 pi)$ onde o *i* representa o número de bandas únicas e o *pi* representa a abundância relativa das bandas ^[88] e o índice de Pielou ou índice de equitabilidade, J, que determina ou não a dominância de filótipos presentes nas amostras^[89]. O índice de equitabilidade expressa a relação entre a diversidade real e a diversidade máxima teórica, ou seja, relaciona o H calculado anteriormente com um H máximo possível. Este índice é calculado pelas seguintes fórmulas:

$$J = (H \text{ observado} / H \text{ máximo}),$$

$$H \text{ máximo} = \log S,$$

S é o número de espécies observadas, neste caso, o número de bandas em análise.

3. Resultados

3.1. Extração do DNA microbiano dos sedimentos.

O DNA microbiano das 90 amostras foi extraído do sedimento segundo as orientações do fornecedor do kit utilizado. Esta tarefa foi dividida em seis ensaios, agrupando as amostras pelo tempo de duração da experiência e pelo tipo de sedimento (com ou sem planta). Em gel de agarose a 0,8% foi possível visualizar bandas de elevado peso molecular em grande parte das amostras. Esta visualização mostra que o processo de extração foi efetuado com sucesso. Na Figura 10 é apresentado um exemplo dos géis obtidos, sendo este correspondente a amostras de rizosfera com exposição a mercúrio durante 6 meses (T2 P). O pormenor de todos os géis pode ser observado nos anexos.

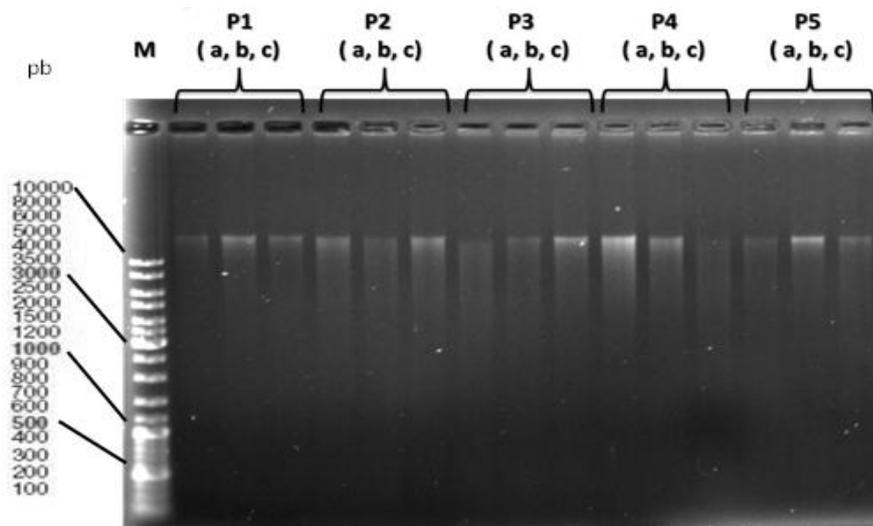


Figura 10: Gel de agarose 0,8% correspondente a DNA total extraído de amostras de rizosfera com 6 meses de exposição ao mercúrio (T2 P). As amostras indicadas com P1 a P5 correspondem aos diferentes microcosmos construídos que sofreram estas condições e as letras a, b e c correspondem a réplicas recolhidas de cada um dos microcosmos. São também indicados na imagem os pesos moleculares referentes ao marcador de pesos moleculares utilizado.

3.2. Amplificação de uma porção da região V3 do gene do rRNA 16S

As amostras de DNA total foram usadas como molde em reações de PCR efetuadas para amplificar uma fração do gene do rRNA 16S. Os fragmentos resultantes foram analisados em gel de agarose. A percentagem do gel de agarose é mais elevada do que a usada para separação do DNA genómico uma vez que os fragmentos amplificados têm apenas cerca de 200 pb, como visualizado na Figura 11. Em todas as amostras é visível uma boa amplificação. O pormenor de todos os géis pode ser visualizado nos anexos.

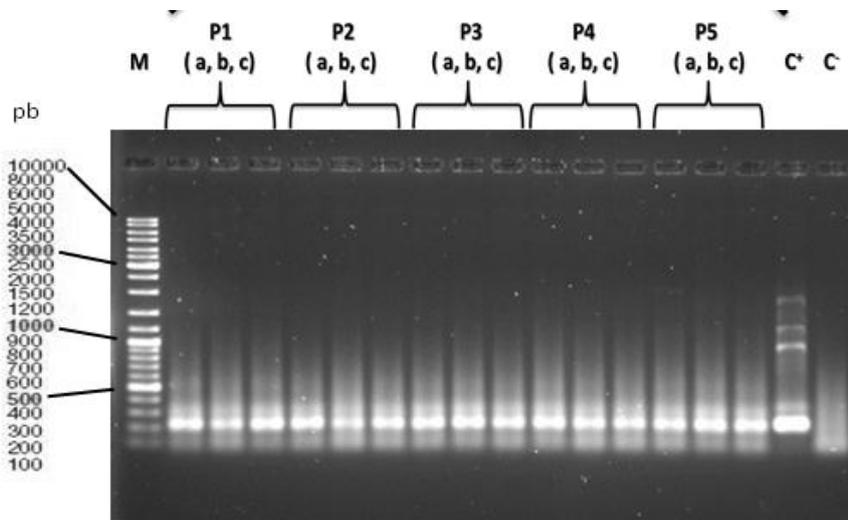


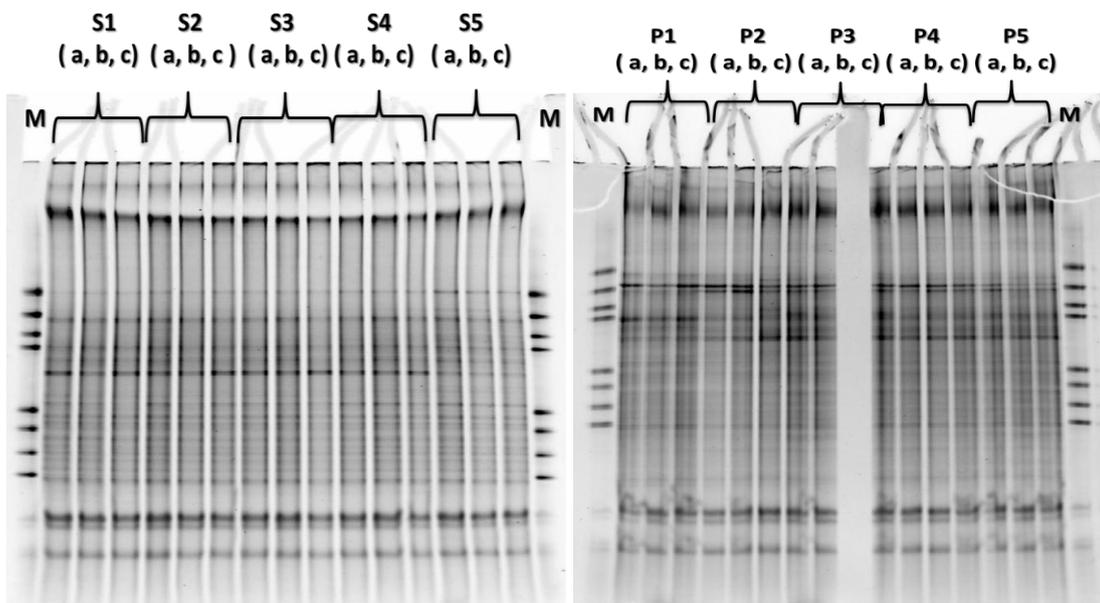
Figura 11: Gel de agarose a 1,5% com fragmentos correspondentes à região V3 do rRNA 16S amplificados por PCR a partir da amostra de DNA total de amostras T2 P. As amostras indicadas com P1 a P5 correspondem aos diferentes microcosmos construídos que sofreram estas condições e as letras a, b e c correspondem a réplicas recolhidas de cada um dos microcosmos. São também indicados na imagem os pesos moleculares referentes ao marcador de pesos moleculares utilizado.

3.3. Perfis de DGGE

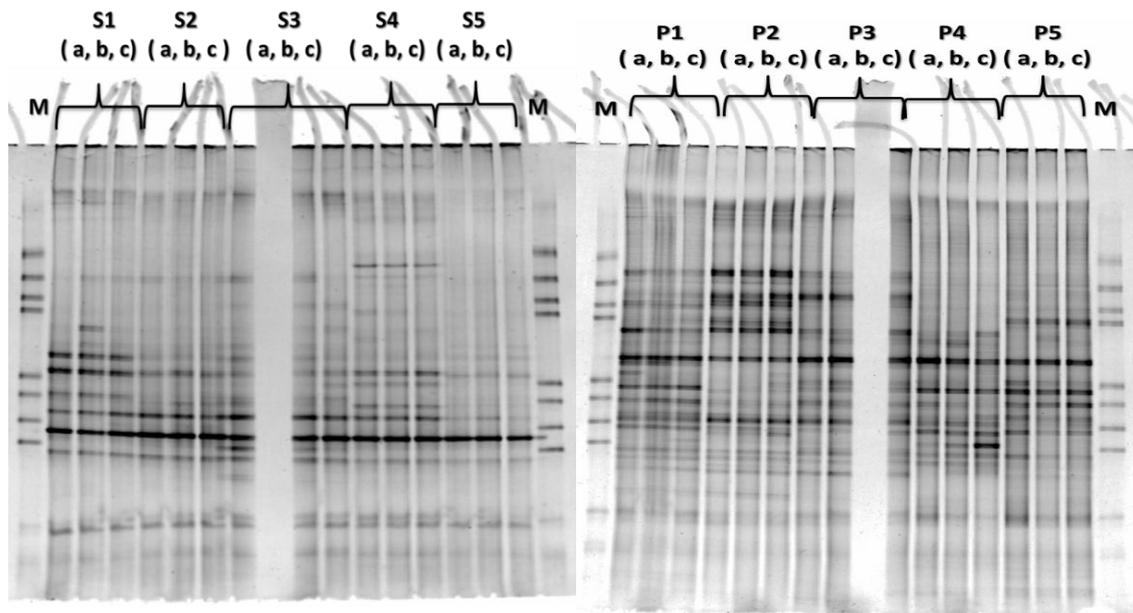
Demonstrando condições para ser analisado por esta técnica, o DNA amplificado anteriormente foi aplicado em géis de poliacrilamida. Os géis foram obtidos com um gradiente de 35%-62,5% e são apresentados na Figura 12. Estes foram realizados em separado conforme os tipos das amostras e todas as réplicas recolhidas foram analisadas. O marcador foi aplicado em ambos os extremos do gel principalmente para verificação do gradiente e para o enquadramento dos perfis obtidos.

Todos os géis serão apresentados em pormenor de forma a fazer notar os tipos de alterações provocadas pelos fatores em estudo.

- Tempo 0, Sedimento (a) e Planta (b):



- Tempo 1, Sedimento (c) e Planta (d):



- Tempo 2, Sedimento (e) e Planta (f):

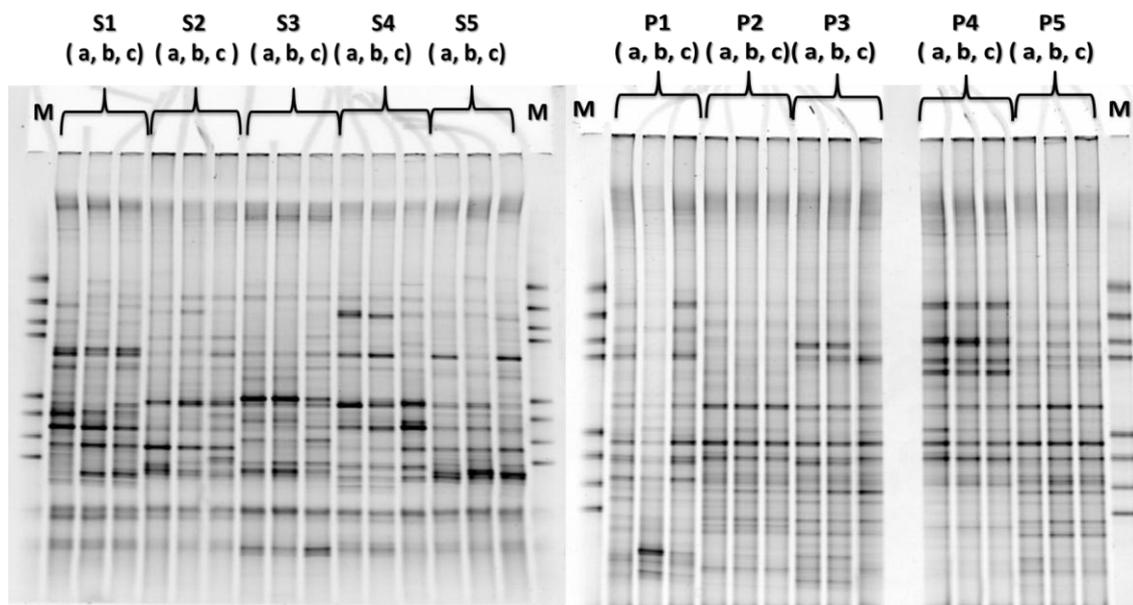


Figura 12: Géis de DGGE correspondentes a todos os tipos de amostras analisadas: (a), amostras S do tempo 0, (b), amostras P do tempo 0, (c), amostras S do tempo 1, (d), amostras P do tempo 1, (e), amostras S do tempo 2 e (f), amostras P do tempo 2. As amostras indicadas com P1 a P5 (rizosfera) e S1 a S5 (sedimento) correspondem aos diferentes microcosmos construídos que sofreram estas condições e as letras a, b e c correspondem a réplicas recolhidas de cada um desses microcosmos.

Por observação dos perfis originários das amostras de sedimento do tempo 0 (T0 S1 a S5), nota-se uma elevada homogeneidade entre perfis que é independente do microcosmo ou da réplica. Estes perfis são caracterizados por poucas bandas dominantes. Existe um número muito elevado de bandas por perfil (15-25 bandas) onde a maior parte tem pouca intensidade. Neste caso, não só os perfis das réplicas a, b e c são reprodutíveis mas também os perfis das amostras dos microcosmos diferentes das mesmas condições. Em geral as bandas detetáveis são comuns a todas as amostras, variando unicamente a intensidade de algumas delas.

Os perfis provenientes de amostras de rizosfera do tempo 0 (T0 P1 a P5) mantêm também alguma similaridade entre eles mas com mais diferenças do que nas amostras descritas anteriormente, principalmente no que diz respeito à intensidade de algumas bandas. Existe neste caso um maior número de bandas dominantes e mantem-se a elevada reprodutibilidade, evidenciada pelo mesmo número de bandas/posições nos quinze perfis. No geral, o perfil de bandas é mais intenso do que nas amostras T0 S1 a S5. Os perfis pertencentes ao tempo 0 (S e P) são análogos no que diz respeito à reprodutibilidade, elevado número de bandas e poucas bandas dominantes.

As amostras do tempo 1 demonstram diferenças significativas relativamente às amostras do tempo 0. Nas amostras T1 S1 a S5 os perfis já não são todos semelhantes, notando-se diferenças entre os diferentes microcosmos. Apesar disto, a reprodutibilidade das réplicas a, b e c mantêm-se.

Já nas amostras T1 P1 a P5, é ainda mais nítida a diferença entre perfis de microcosmos diferentes, com base na posição e intensidade das bandas. Nestes perfis aumentou o número de bandas dominantes relativamente a todas as amostras anteriores (T0 S1 a S5, T0 P1 a P5 e T1 S1 a S5) e o número de bandas com fraca intensidade, que até agora estava sempre em maior número, é menor, estando numa proporção mais equilibrada com as bandas de maior intensidade. O número de bandas comuns entre amostras de microcosmos diferentes é menor.

Quanto às amostras provenientes do maior tempo de incubação, T2, o número de bandas mais intensas por perfil é maior do que nas amostras anteriores onde existiam bandas com muito fraca intensidade. Os perfis nas amostras T2 S são mais ricos em

frações dominantes com elevado conteúdo em GC e apenas podem ser consideradas reprodutíveis as réplicas a, b e c.

As amostras T2 P1 a P5 têm características semelhantes às amostras T2 S1 a S5 relativamente à maior intensidade das bandas do que nas amostras anteriores, havendo neste caso menos bandas de baixa intensidade e menos bandas em comum entre perfis de microcosmos diferentes. As amostras do tempo 2 possuem aparentemente os perfis menos complexos possivelmente pelo fato do número de bandas de fraca intensidade ser menor.

Estes perfis de DGGE demonstram grupos estáveis presentes em ambos os tipos de sedimentos, S e P.

3.4. Análise dos perfis de DGGE resultantes

3.4.1. Amostras de sedimento com rizosfera (P)

No total foram obtidos 45 perfis de bandas de DGGE provenientes de rizosfera (15 T0, 15 T1 e 15 T2), os quais foram alinhados de forma a perceber que percentagem de similaridades existia entre eles quer no geral quer individualmente por tempo de incubação em microcosmo. Encontra-se na Figura 13 o dendrograma resultante da comparação destes perfis.

É possível ver claramente na figura que todas as amostras de planta do tempo 0 se agrupam separadamente das amostras dos outros dois tempos de exposição, com uma percentagem de similaridade inferior a 5%. As amostras T1 e T2 não são agrupadas totalmente consoante os tempos de incubação.

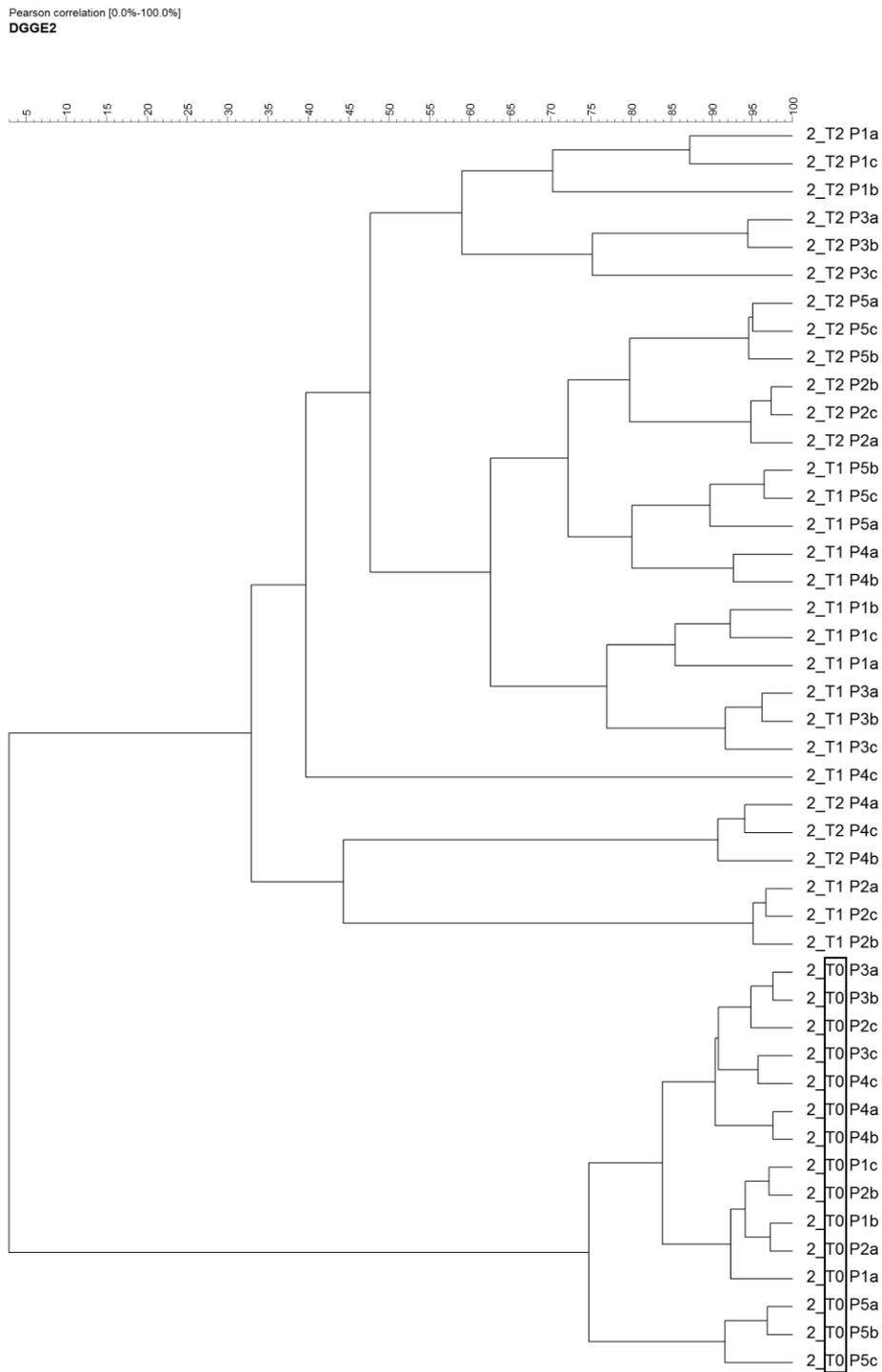


Figura 13: Dendrograma das amostras de rizosfera, elaborado de acordo com as semelhanças estruturais inferidas pela posição das bandas referentes ao rDNA 16S, separadas por DGGE. Aspectos relevantes para discussão relativamente às percentagens de similaridade encontram-se assinalados no dendrograma.

3.4.2. Amostras de sedimento (S)

No total foram obtidos 45 perfis de bandas de DGGE provenientes de sedimento sem planta, os quais foram alinhados de forma a fazer uma comparação mais conclusiva acerca destas amostras. Encontra-se na Figura 14 o dendrograma resultante deste alinhamento onde estão assinalados aspetos a discutir posteriormente.

Assim como nas amostras de planta, as amostras do T0 têm similaridade inferior a 5% relativamente às amostras restantes. As amostras do T1 e T2 têm cerca de 12,5% de similaridade entre si e dividem-se perfeitamente nos dois grupos respetivos.

As amostras T1 são similares entre elas cerca de (similaridade > 62,5%) enquanto as amostras de T2 são menos similares com uma percentagem de similaridade de apenas (similaridade > 27,5%).

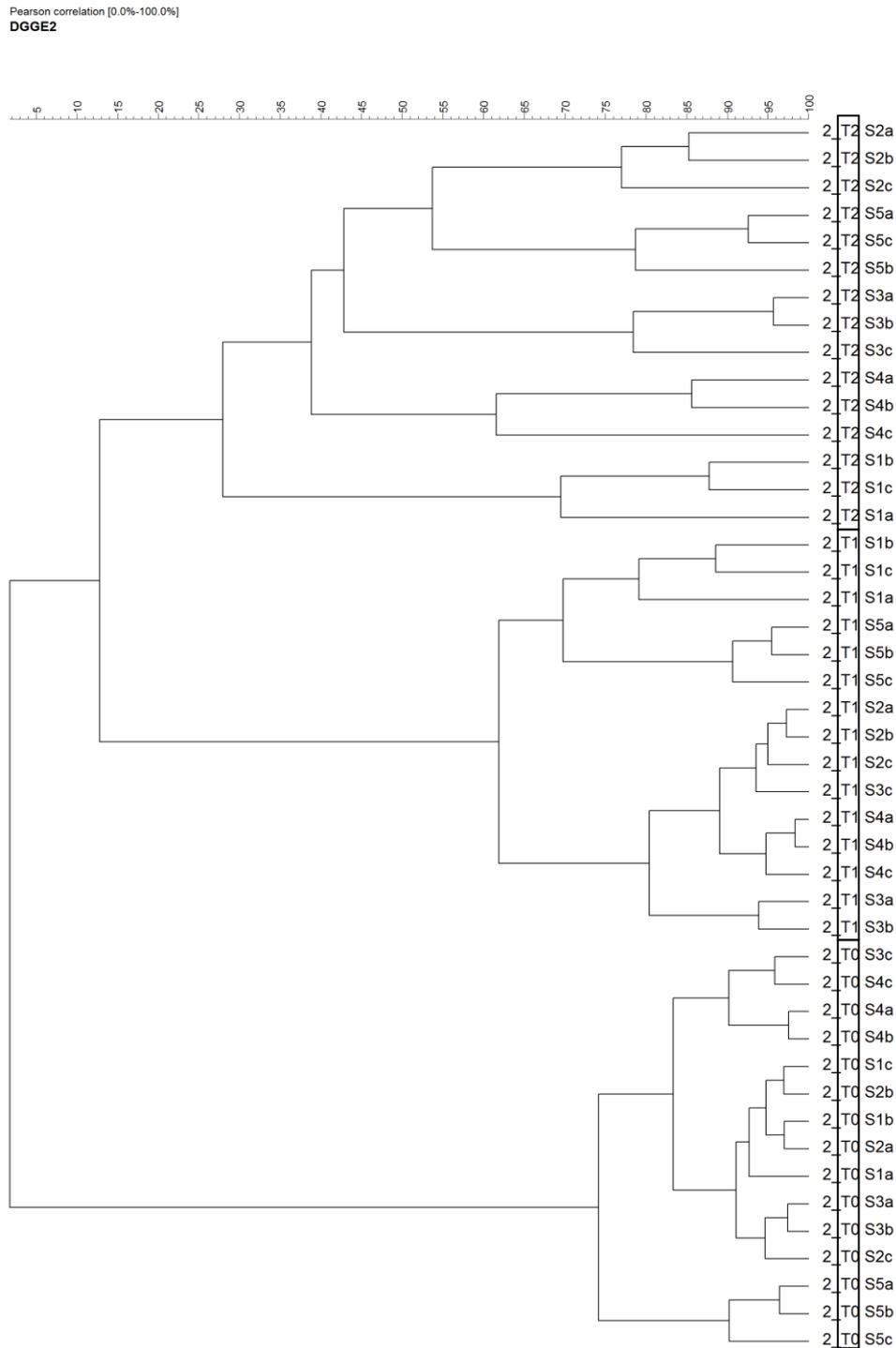


Figura 14: Dendrograma das amostras de sedimento, elaborado de acordo com as semelhanças estruturais inferidas pela posição das bandas referentes ao rDNA 16S, separadas por DGGE. Aspectos relevantes para discussão relativamente às percentagens de similaridade encontram-se assinalados no dendrograma.

3.5. Amostras do tempo 0

Relativamente aos perfis de DGGE de amostras do tempo 0, estes foram alinhados segundo a sua posição no gel para procurar similaridades ou diferenças relevantes entre elas (Figura 15). Estas amostras servem de controlo, para comparação, uma vez que as comunidades microbianas dos outros tempos de incubação podem ser consideradas evoluções destas.

Nesta figura, observa-se uma similaridade máxima de 74,5% entre as amostras P e S. No entanto, elas não agrupam segundo o tipo de sedimento a que pertencem.

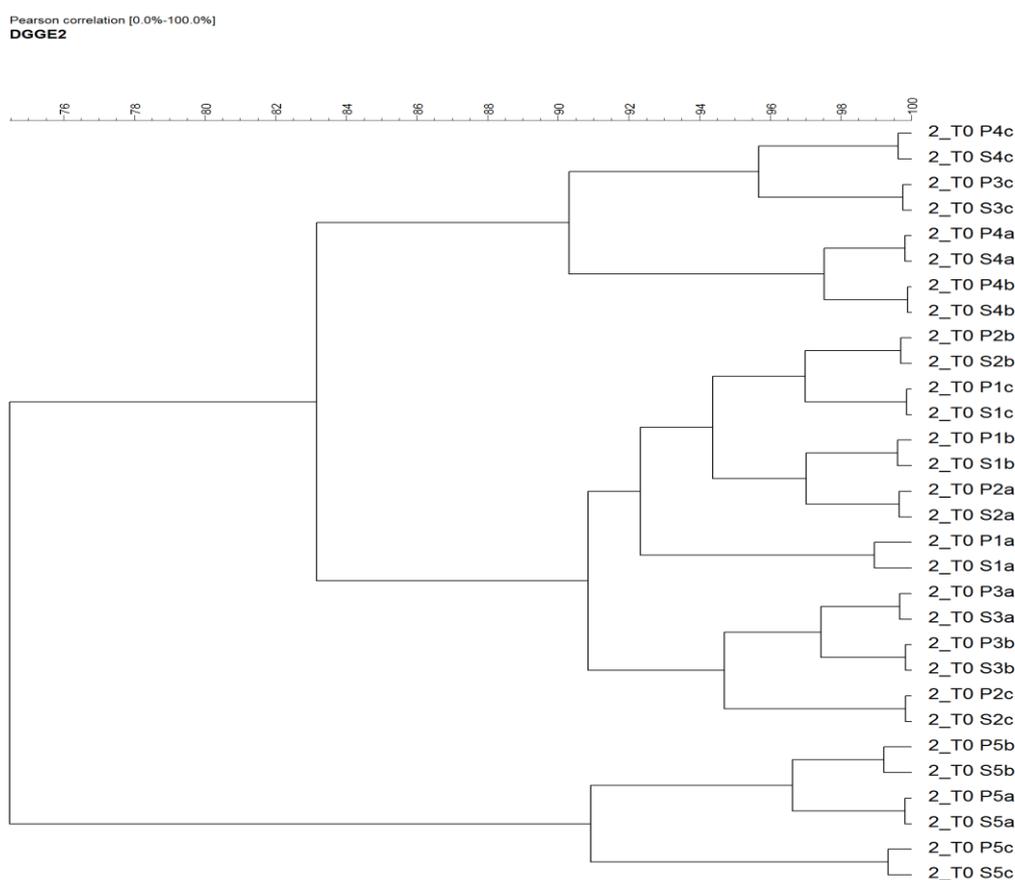


Figura 15: Dendrograma das amostras T0, elaborado de acordo com as semelhanças estruturais inferidas pela posição das bandas referentes ao rDNA 16S, separadas por DGGE.

3.6. Amostras do tempo 1

Relativamente aos perfis de DGGE de amostras do tempo 1, estes foram alinhados segundo a sua posição no gel para construir uma matriz de similaridade. O dendrograma é apresentado na Figura 16 e as secções assinaladas serão discutidas posteriormente.

Neste tempo de amostragem, os grupos de amostras P e S têm uma percentagem de similaridade inferior a 5%. Como observado na figura, as amostras pertencentes aos dois grupos de sedimentos têm uma similaridade máxima de 40 e 62,5%, para planta e sedimento, respetivamente. Dentro destes grupos, à exceção da réplica S3c, todas as outras réplicas a, b e c de cada microcosmo são agrupadas com elevada similaridade.

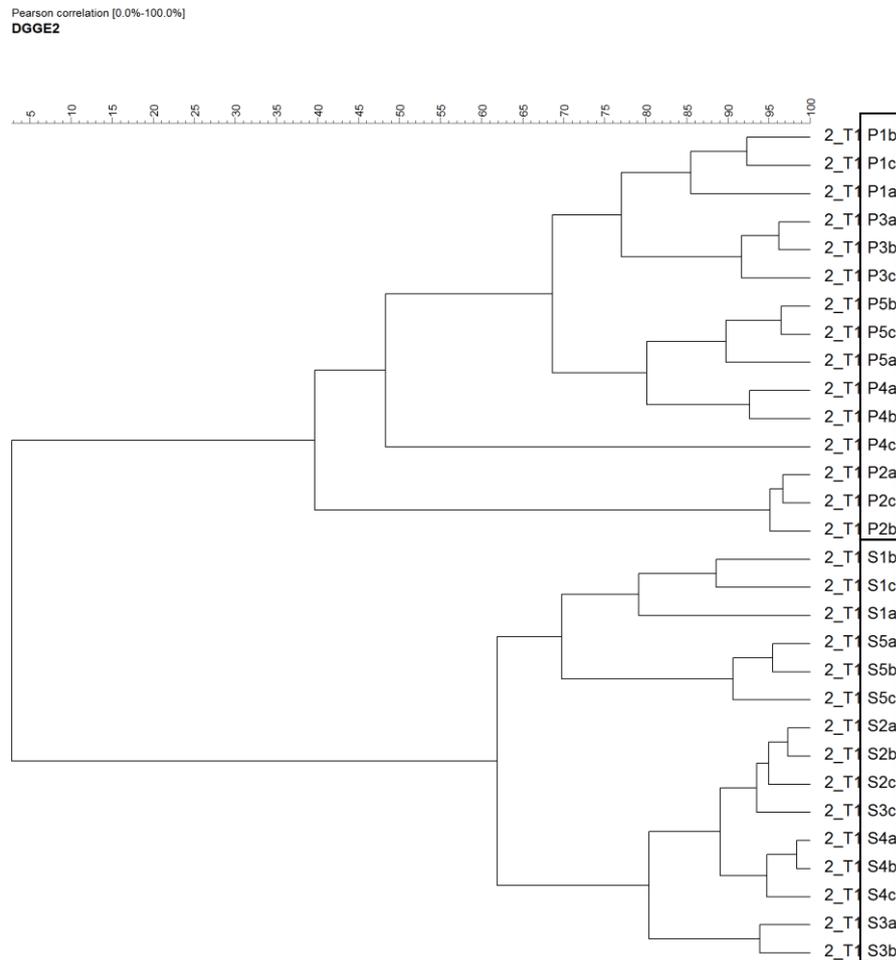
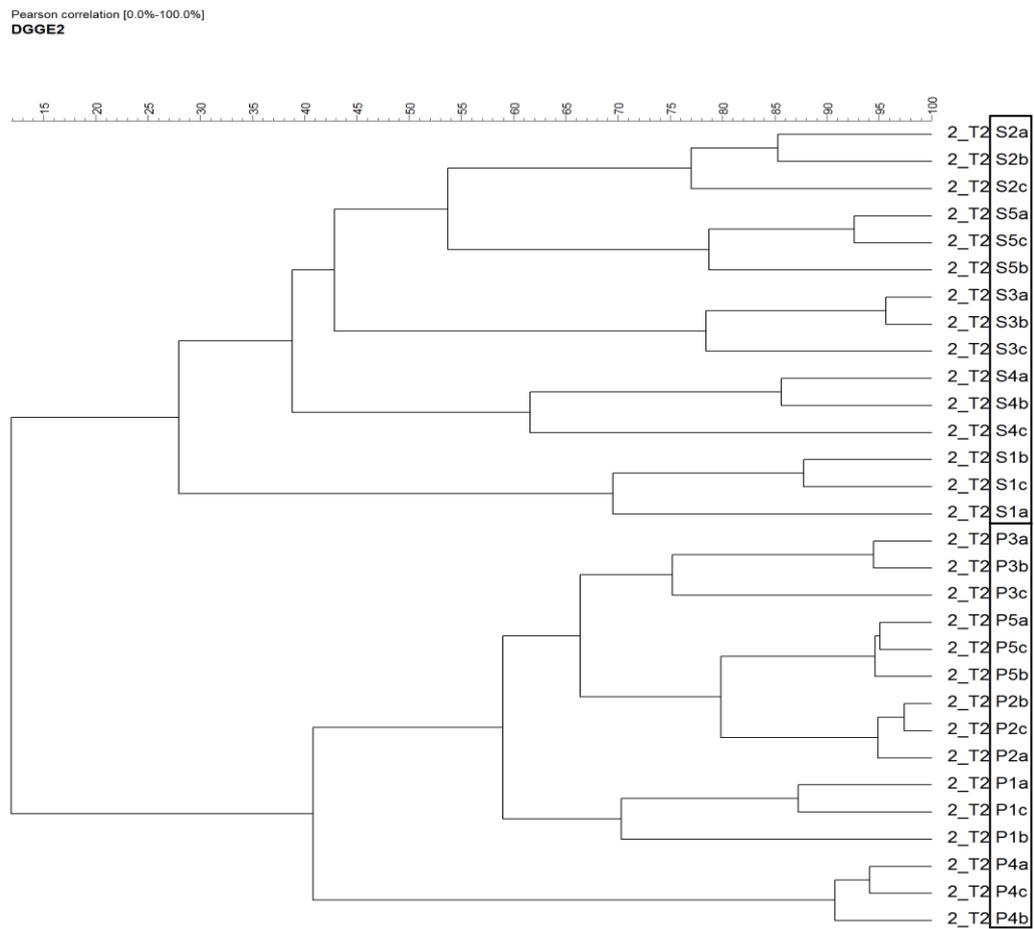


Figura 16: Dendrograma das amostras T1, elaborado de acordo com as semelhanças estruturais inferidas pela posição das bandas referentes ao rDNA 16S, separadas por DGGE.

3.7. Amostras do tempo 2

Os perfis de DGGE de amostras do tempo máximo de incubação, o tempo 2, foram alinhados tal como nos outros dois tempos segundo a sua posição no gel. O dendrograma resultante é apresentado na Figura 17.

Relativamente às amostras T2 P1 a P5 e T2 S1 a S5, há muito pouca similaridade entre estas, cerca de 10%, quando comparado o tempo de incubação. A percentagem de similaridade entre as amostras T2P tem um valor máximo de 27,5% quando anteriormente (T1P) era 40% e para amostras S, a percentagem de similaridade baixou de 62,5 (T1S) para 42,5% (T2S).



t

Figura 17: Dendrograma das amostras T2, elaborado de acordo com as semelhanças estruturais inferidas pela posição das bandas referentes ao rDNA 16S, separadas por DGGE.

3.8. Análise de *clustering* de todas as amostras.

Foi criada uma matriz de similaridade dos géis de DGGE contendo os perfis das 90 amostras (Figura 18).

Quanto às amostras T0 (P1 a P5 e S1 a S5), estas têm uma percentagem de similaridade inferior a 4% relativamente às amostras dos outros tempos de incubação, T1 e T2. Além disso, os microcosmos do tempo T0 P1 a P5, T0 S1 a S5 e todas as réplicas a, b e c de cada um dos microcosmos, têm elevadas percentagens de similaridade entre elas. A elevada similaridade entre todas as amostras T0, cerca de 74%, é visível no dendrograma também pelo alinhamento de amostras com elevadas percentagens de similaridade, por exemplo cerca de 98% entre amostras P5c e S5c, amostras de sedimento com planta e sem planta.

Após esta observação, é igualmente distinto o agrupamento de amostras S e amostras P em separado, independentemente do tempo de incubação dos microcosmos. Verifica-se uma elevada variabilidade entre as amostras correspondentes aos tempos de incubação 1 e 2 principalmente no que diz respeito às amostras de sedimento. Entre as amostras P destes dois tempos a percentagem mínima de similaridade é de 33%. Nas amostras de sedimento é ainda nítida uma distinção entre as amostras T2 S e T1 S. As amostras T2 têm um mínimo de similaridade de 28% e as amostras T1 de 59%. Esta diferenciação não ocorre nas amostras de Planta, onde as amostras do tempo 1 e do tempo 2 agrupam nos mesmos *clusters*.

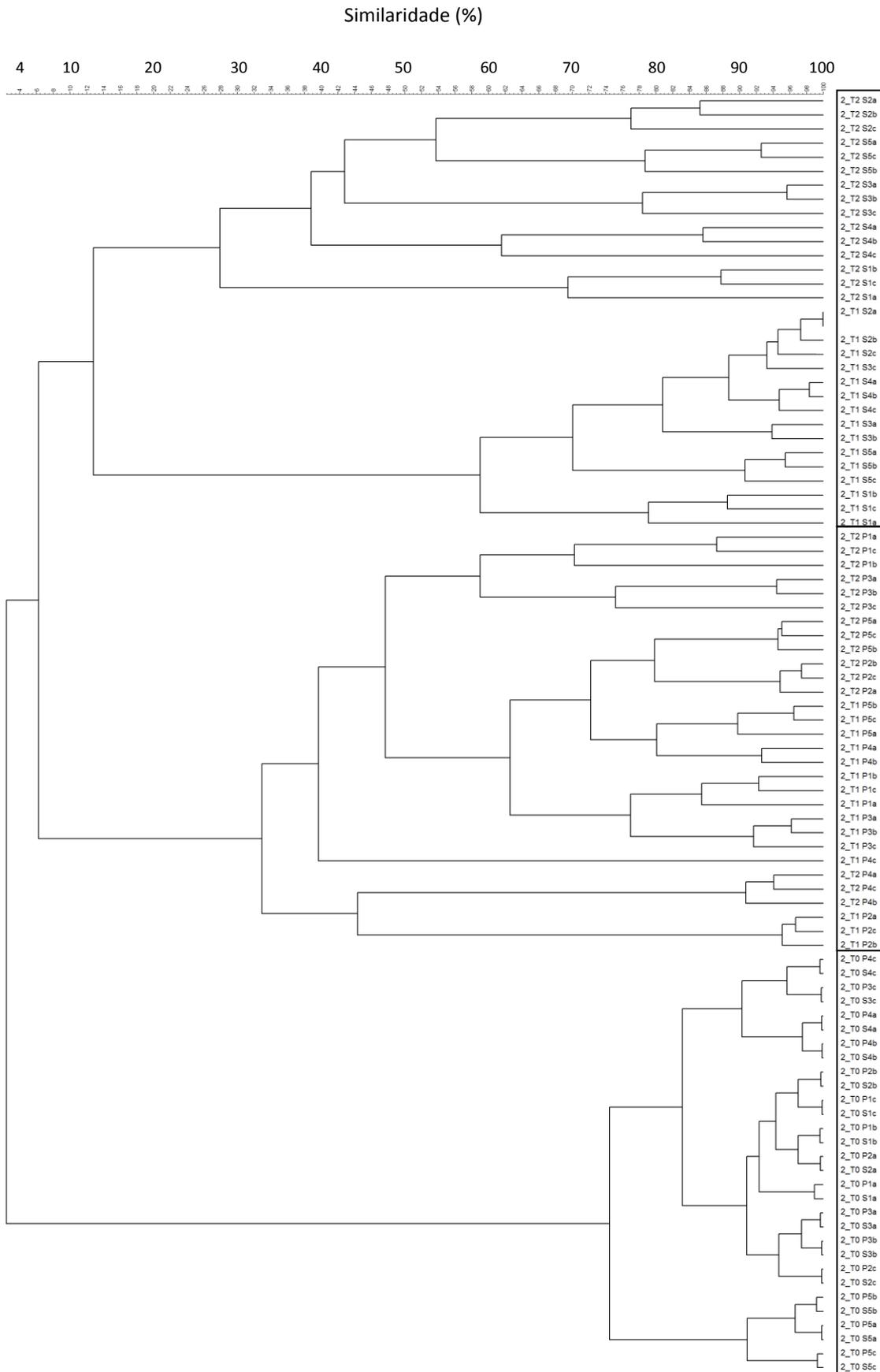


Figura 18: Dendrograma obtido após análise de todas as amostras, elaborado de acordo com as semelhanças estruturais inferidas pela posição das bandas referentes ao rDNA 16S, separadas por DGGE.

3.9. Índices de diversidade, H, e de equitabilidade, J.

Relativamente aos índices de diversidade e equitabilidade estes foram calculados e apresentados com o respetivo desvio padrão. Os índices não diferem muito uns dos outros e graficamente é possível fazer uma comparação entre os tempos de incubação e os tipos de sedimento.

O índice de Shannon-Weaver avalia a diversidade das amostras, sendo de esperar que amostras com um maior número de bandas tenham maiores índices de Shannon-Weaver. O que acontece nas amostras analisadas é que existe um número elevado de bandas em todos os perfis. Neste caso, o que difere maioritariamente são as intensidades dessas mesmas bandas, no entanto todas as bandas existentes foram consideradas. Os valores resultantes deste índice têm valores de desvio padrão um pouco elevados entre réplicas a, b e c mas graficamente tal não se faz notar porque todas são afetadas por desvios. Apesar disso, os dados obtidos do índice de equitabilidade completam a informação para saber um pouco mais acerca da maior ou menor uniformidade das comunidades.

Na Tabela 5 encontram-se os valores dos índices obtidos a partir dos perfis de DGGE. Como indicado acima, uma análise das amostras conjugando os dois índices parece ser a melhor opção para posteriormente discutir estes resultados. Os valores do Índice de Shannon-Weaver encontram-se também representados graficamente tendo em conta o sedimento sem planta e com planta.

Nas amostras T0, o índice de Shannon-Weaver é maior nas amostras S, tendo valores superiores a 1,1 em todos os microcosmos, ao contrário das amostras P que têm valores de 1 ou inferiores. Fazendo uma comparação com o índice de equitabilidade, este mostra uma distribuição equitativa dos filótipos também nas amostras S, apesar das diferenças para com as amostras P não serem muito significativas, como visto nos dendrogramas.

Relativamente às amostras T1, há uma mudança acentuada relativamente às amostras T0 que as precederam, principalmente em amostras S. Estas apresentam um índice de Shannon-Weaver mínimo de 0,6 e um máximo de 0,9 enquanto as amostras P possuem índices de Shannon-Weaver superiores a 1,0. Esta menor diversidade das

amostras S é também acompanhada por uma equitabilidade menor relativamente às amostras P.

Analisando as representações gráficas (Gráfico 1 e Gráfico 2), são visíveis os valores médios do índice de Shannon-Weaver para as amostras de rizosfera e sedimento em separado. Nas amostras de rizosfera, nota-se um índice mais elevado para as amostras T1 P em quase todos os microcosmos relativamente aos restantes tempos de exposição e notam-se índices mais baixos nas amostras T0 P. Já nas amostras de sedimento, a maior diversidade é visualizada no tempo 0, decrescendo depois nas amostras T1 S e ainda mais nas amostras T2 S.

No geral, pode-se considerar que o índice de Shannon-Weaver aumentou nas amostras T1 P e T2P, sendo este aumento mais notório nas amostras T1 P. Nas amostras S aconteceu o inverso, havendo uma grande diminuição do índice nas amostras T1 S e uma diminuição menor nas amostras T2 S, relativamente às amostras T0 S

O índice de equitabilidade está situado num intervalo de 0 a 1 onde o valor 1 indica que semelhante distribuição dos filótipos na comunidade é equitativa não ocorrendo filótipos dominantes. Nas amostras analisadas os valores são muito próximos de 1 indicando uma distribuição equitativa das espécies. Apesar disso há uma nítida diminuição deste índice na passagem do tempo 0 para o tempo 1 quer nas amostras P quer nas amostras S.

Tabela 5: Índices de diversidade e de equitabilidade de todos os tempos de amostragem, de sedimento com e sem planta e ainda de todos os microcosmos montados (1 a 5). Devido à reprodutibilidade das réplicas a, b e c foi efetuada uma média dos índices obtidos, assim como dos desvios padrão (δ) e o valor inserido como valor do respetivo microcosmo.

Microcosmo			1	2	3	4	5
T0	P	Shannon Weaver	0,0571	0,0844	0,0570	0,0424	0,0235
		δ	0,9665	0,9623	0,9798	0,9749	0,9847
		Equitabilidade	0,0128	0,0389	0,0044	0,0116	0,0020
		δ	1,2033	1,1992	1,1875	1,2018	1,1931
	S	Shannon Weaver	0,0066	0,0171	0,0418	0,0106	0,0166
		δ	0,9779	0,9746	0,9723	0,9767	0,9697
		Equitabilidade	0,0053	0,0139	0,0172	0,0086	0,0135
		δ	1,0946	1,2249	1,2020	1,0377	1,0549
T1	P	Shannon Weaver	0,0291	0,0071	0,0117	0,0343	0,0546
		δ	0,9557	0,9638	0,9581	0,9740	0,9585
		Equitabilidade	0,0031	0,0059	0,0143	0,0073	0,0084
		δ	0,8606	0,8101	0,9366	0,9142	0,6083
	S	Shannon Weaver	0,0397	0,0374	0,0271	0,0419	0,0758
		δ	0,9351	0,9370	0,9384	0,9299	0,8425
		Equitabilidade	0,0151	0,0078	0,0176	0,0053	0,1348
		δ	1,0995	1,0616	1,1514	1,0238	1,0673
T2	P	Shannon Weaver	0,1311	0,0328	0,0448	0,0300	0,0623
		δ	0,9055	0,9538	0,9647	0,9598	0,9603
		Equitabilidade	0,0862	0,0124	0,0108	0,0119	0,0048
		δ	1,0559	1,0167	1,1361	1,0593	0,9504
	S	Shannon Weaver	0,0806	0,0593	0,0110	0,0087	0,0451
		δ	0,9503	0,9426	0,9660	0,9252	0,9517
		Equitabilidade	0,0150	0,0282	0,0093	0,0215	0,0108
		δ	0,0571	0,0844	0,0570	0,0424	0,0235

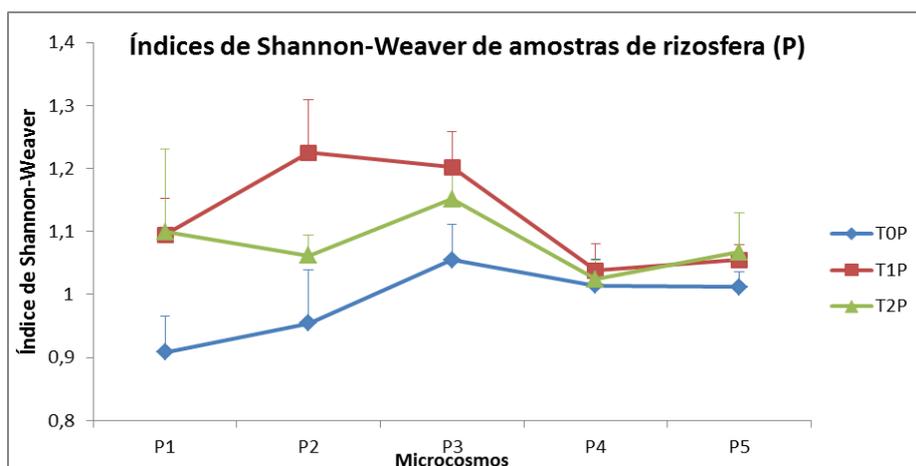


Gráfico 1: Representação gráfica da média dos valores do índice de Shannon-Weaver das réplicas a, b e c de cada microcosmo, com o respetivo desvio padrão, em amostras de rizosfera.

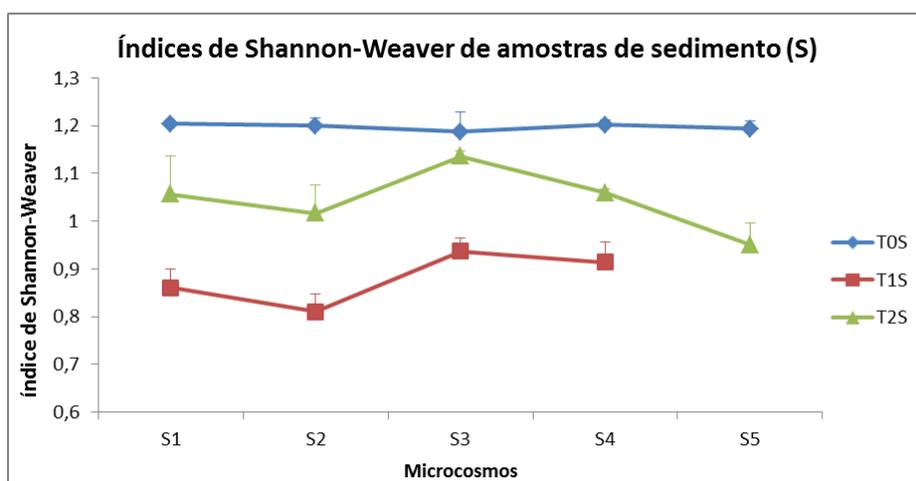


Gráfico 2: Representação gráfica da média dos valores do índice de Shannon-Weaver das réplicas a, b e c de cada microcosmo, com o respetivo desvio padrão, em amostras de sedimento.

4. Discussão

Os microrganismos presentes em sedimentos representam uma fração importante da biota, tanto pela diversidade de espécies como pela multiplicidade de atividades metabólicas desempenhadas. Sabe-se que atuam em ciclos biogeoquímicos de vários nutrientes, estando envolvidos na decomposição e mineralização da matéria orgânica, disponibilização de nutrientes retidos nos coloides e fixação biológica de Nitrogênio^[90]. Estes atuam também de forma muito intensa nas cadeias tróficas e nos diversos processos ecológicos, possuindo um papel importante na descoberta da história passada do ambiente em estudo^[90-91]. Por essa razão é essencial entender o tipo de relação mantida entre os microrganismos e o ambiente através do estudo da diversidade estrutural e funcional das comunidades microbianas e como elas respondem aos vários distúrbios naturais ou antropológicos. No entanto há lacunas de conhecimento, relativo à diversidade e função exercida pelos microrganismos no seu ambiente natural. Parte desse problema deve-se ao paradigma de que esses microrganismos apresentam uma grande diversidade e somente uma pequena porção pode ser cultivada^[92], já que nem sempre são conhecidas as exigências nutricionais, inter-relações e interdependências com os demais componentes^[93]. A extração de ácidos nucleicos diretamente de sedimentos e outros ambientes, onde existem comunidades microbianas, tem vindo a ser bastante utilizada de forma a abranger um maior número de microrganismos, e não apenas aqueles que são cultiváveis. A implementação de técnicas baseadas em DNA e RNA permitem uma investigação mais completa da estrutura da comunidade microbiana, permitindo estudar até 99% dos microrganismos presentes num dado ambiente^[94].

O tipo de contaminação existente nos sedimentos analisados neste estudo complica a extração do DNA por necessitar de uma separação de substâncias que interferem na análise do DNA, como substâncias húmicas e metais^[95]. Apesar do DNA extraído apresentar alguma instabilidade quando guardado a -20°C, o método de extração utilizado resultou numa recolha de DNA de elevado peso molecular e caracteriza-se por ser rápido, fácil e acessível. A visualização dos géis resultantes das eletroforeses quer de DNA total quer da região V3 do rDNA 16S amplificada por PCR mostrou quantidades perceptíveis em todas as amostras e uma boa reprodutibilidade em todas as réplicas, quer do mesmo microcosmo, quer de microcosmos diferentes.

A amplificação do rDNA 16S foi efetuada pelo fato deste gene estar presente em todos os microrganismos, em regiões bem definidas para a classificação taxonômica e por existirem bases de dados com informações para comparação^[92]. Problemas associados à sua utilização têm a ver com diferentes afinidades e especificidade dos *primers* e diferente número de cópias dos genes alvo nos microrganismos. Ambos os *primers* utilizados emparelham com a maior parte das sequências bacterianas de DNA ribossomal^[92]. Neste trabalho, permitiram amplificar a partir de comunidades quer de rizosfera, quer de sedimento e as bandas demonstraram integridade do DNA e concentração suficiente para o DGGE. Até este ponto não foram detetadas grandes barreiras devidas à natureza das amostras e não foram notadas diferenças a nível de quantidades amplificadas, o que demonstra que o mercúrio provavelmente não é um agente que impede este tipo de análises.

Já existem descobertas indicativas da alteração de comunidades bacterianas, na sua estrutura genética e diversidade, quando expostas ao mercúrio^[92]. Neste trabalho o mercúrio e a presença de planta nos sedimentos parecem provocar estes efeitos.

4.1. DGGE

O DGGE é a abordagem preferida em *fingerprintings* ambientais uma vez que: permite que sejam analisadas amostras múltiplas, ultrapassa a questão da diminuição da diversidade das amostras quando cultivadas, monitoriza os desvios na comunidade e a sucessão ao longo do tempo, leva à determinação de perfis de comunidades provenientes de diferentes condições ambientais (especialmente em ecossistemas alterados) e torna possível a aquisição de informação taxonómica pela análise filogenética^[82].

A técnica de DGGE é uma técnica demorada e laboriosa. Existem muitos fatores externos que podem fazer com que um gel de DGGE não forneça o resultado esperado, como a temperatura de polimerização do gel, a aplicação das amostras ou mesmo a coloração do gel. Por estas e outras razões esta é uma técnica que exige muito do utilizador e por vezes a obtenção de um gel analisável pode ser difícil.

A viabilidade da técnica de PCR-DGGE para analisar a estrutura das comunidades bacterianas de sedimentos foi avaliada por um levantamento comparativo dos perfis. O presente estudo mostra que de diferentes sedimentos surgem diferentes perfis de DGGE característicos de cada amostra ou tipos de amostras (como as amostras T0). Dos três tempos, é no T0 que os perfis são mais estáveis provavelmente por pertencerem aos microcosmos com menor tempo de incubação. Os limites de deteção parecem ser elevados uma vez que há perfis de bandas com diversas intensidades.

Num primeiro momento (tempo 0) a comunidade não sofreu grandes alterações pela presença da planta de certa forma devido ao pouco tempo de incubação e ao efeito das raízes ainda não se fazerem notar. Quando aumentado o tempo de incubação, aí sim foi notória uma alteração das comunidades microbianas relativamente ao tempo 0 e quer em sedimento, quer em rizosfera. O efeito da planta foi verificado pelo aparecimento/desaparecimento de bandas nos perfis analisados. Neste trabalho teria sido importante incluir uma amostragem num tempo 0 real, ou seja, no momento da montagem dos microcosmos, para ter um termo de comparação realmente inicial.

Apesar desta análise, há ambiguidades que restringem conceptualmente o uso/interpretação do PCR-DGGE de amostras de DNA de sedimentos. Entre eles destaca-se a falta de genuinidade de produtos provenientes do PCR substituídos muitas vezes por

formas quiméricas que na realidade não representam tipos bacterianos ou o perfil de bandas que pode não corresponder necessariamente a um tipo bacteriano por banda. Frações bacterianas únicas podem ser representadas por mais do que uma banda nos perfis de DGGE devido à presença de várias cópias de rDNA 16S com sequências ligeiramente diferentes ou, reciprocamente, bandas em posições similares podem ser originadas por diferentes sequências de rDNA 16S com comportamento de *melting* similares^[92]. Neste trabalho estes problemas não foram tidos em conta na prática mas sabe-se que provavelmente aconteceram casos destes.

4.2. Similaridades entre perfis de DGGE

Analisando os dendrogramas obtidos, é possível dizer que ao longo do tempo de incubação existem mudanças nas comunidades associadas a plantas relativamente a comunidades sem planta.

No primeiro dendrograma, referente ao alinhamento de todas as amostras P, é nítido um afastamento entre as amostras T0 P, e os outros grupos, T1 P e T2 P. É também visível um agrupamento entre as amostras de rizosfera do tempo de exposição respetivo, no entanto não é um agrupamento total. A separação das amostras T0 P, que detiveram pouco tempo de adaptação a este tipo de ambiente (um mês), pode ser explicada pelo efeito da rizosfera nas comunidades das amostras T1 P e T2 P. Por esta razão, as comunidades T1 e T2 são próximas devido ao efeito da planta. Estes resultados são confirmados bibliograficamente. Em 1904, Hiltner^[96] definiu a rizosfera como a região ao redor das raízes, onde há crescimento bacteriano, podendo variar de acordo com fatores relacionados com o solo, idade e espécie vegetal^[74]. Atualmente, a rizosfera é definida como a região do solo que recebe influência direta das raízes, possibilitando proliferação microbiana^[97]. Aqui os microrganismos são cruciais pois têm um papel ativo nas transformações da matéria orgânica e nos ciclos biogeoquímicos dos nutrientes^[74, 98]. As raízes são conhecidas por terem um efeito importante na estrutura e diversidade das comunidades microbianas que habitam o solo e o sedimento junto destas (efeito da rizosfera)^[99]. Estes microrganismos podem ter efeitos positivos, negativos ou neutros na planta, influenciando o seu crescimento e saúde^[100]. A acumulação de microrganismos na rizosfera é suportada pelos exsudados das raízes que tornam o sedimento circundante

rico em açúcares, aminoácidos, hormonas, álcoois, vitaminas e flavonoides^[82, 101]. Frente a esse ambiente diferenciado, alterado quimicamente, não é difícil concluir que na rizosfera a atividade microbiana é diferente daquela que ocorre no solo não rizosférico^[74, 82]. No entanto, estas secreções podem ter um efeito contrário, levando a uma diminuição de certas populações de microrganismos^[83]. Assim, a comunidade microbiana da rizosfera pode variar em estrutura e composição de espécies em função de, além de outros fatores ambientais, do tipo de sedimento, espécie, estado nutricional, idade, *stress* e doenças da planta^[74]. Muitas das comunidades microbianas encontradas na rizosfera são também encontradas em sedimentos. Apesar disso, estão presentes em ambas e são abundantes uma vez que têm um papel fundamental na transformação da matéria orgânica e no ciclo de metais e outros compostos^[102]. Os sedimentos colonizados por macrófitas possuem geralmente concentrações elevadas de metais em relação aos sedimentos não colonizados. Tal fato deve-se à presença das raízes nos sedimentos, que podem acumular os metais ou introduzir alterações nos ciclos destes através do transporte de exsudados orgânicos pelos seus tecidos aerenquimatosos para a zona radicular, responsáveis pela intensa atividade microbiana na rizosfera^[25]. Toda esta informação apoia o fato das comunidades presentes na rizosfera serem muito diferenciadas das comunidades presentes em sedimento não rizosférico.

Relativamente ao alinhamento de amostras S, o grupo de amostras T0 S continua sem alinhar com os outros grupos tal como tinha acontecido nas amostras discutidas anteriormente. Este fato demonstra um efeito do tempo de incubação em microcosmos nas amostras analisadas. A aproximação relativa das amostras T1 e T2, em cerca de 12,5%, é justificada pelo tempo de incubação mais longo destas amostras relativamente às amostras do T0 S. Fazendo uma comparação entre a aproximação das amostras S T1/T2 e P T1/T2, existem diferenças assinaladas. Enquanto as amostras P T1/T2 são 32,5% similares, as amostras S T1/T2 são apenas 12,5%. Tendo em conta que entre elas os tempos de incubação comparados são os mesmos, pode dizer-se que o tipo de sedimento (S ou P) parece ter mais influência nos perfis obtidos do que o tempo de incubação (três meses para T1 e 6 meses para T2). Isto explica-se pelo fato de nos sedimentos sem rizosfera as alterações nutricionais e químicas serem menores do que na rizosfera.

Fazendo uma análise mais extensa aos tempos de exposição 0, 1 e 2, no tempo 0 é nítido o mesmo padrão de bandas, seja em sedimento ou rizosfera. Uma vez que no tempo 0 a incubação é apenas 1 mês, possivelmente as raízes das plantas ainda não estavam bem desenvolvidas e o tempo de incubação é curto para que sejam notadas diferenças relevantes entre comunidades de sedimentos com planta e sem planta. Este fato é mostrado pela proximidade de perfis com as T0 S e T0 P em cerca de 74,5%.

Tendo as amostras T1 um tempo de incubação de 3 meses, é normal que sofram alguma alteração relativamente às amostras de tempo 0. São visíveis na Figura 15 algumas bandas mais intensas nos perfis, indicativo da alteração provocada pelos dois fatores. Neste caso, as amostras P são menos próximas entre si (40%) do que as amostras S (62,5%), demonstrando uma possível ação mais ativa da planta nestas comunidades.

No tempo 2, há uma separação das amostras P das amostras S. A grande diferença relativamente às amostras T1 é uma diminuição da similaridade entre as réplicas P e S respectivamente. Enquanto no tempo 1 as amostras S apresentavam 62,5% de similaridade entre si, no tempo 2, este valor é reduzido para 42,5%. Nas amostras P, a similaridade passa de 40% para 27,5%. Estes decréscimos parecem ser devidos ao aumento do tempo de incubação e ao desenvolvimento da planta e da rizosfera ao longo dos 6 meses. A similaridade mais baixa nas amostras P acontece também neste tempo de amostragem, o que pode significar maior interferência da planta nas comunidades bacterianas quando o ambiente é sujeito ao mercúrio. Estas diferenças podem advir possivelmente de metilmercúrio formado na rizosfera ou pelo estado de *stress* da planta que pode levar indiretamente a alterações na comunidade, como já referido acima. Teria sido importante para esta discussão, a quantificação do metilmercúrio no início e no fim da experiência uma vez que esses dados poderiam explicar determinadas mudanças observadas nas comunidades.

Apesar de em todos os tempos de incubação as réplicas dos microcosmos (a, b e c) serem relativamente similares, o mesmo não acontece com microcosmos diferentes com o mesmo tempo de incubação. No caso de sedimentos com planta, estas diferenças nas comunidades microbianas poderão ser provocadas pelo estado planta, ou seja, estado nutricional, crescimento, *stress*, ou doenças que esta possa ter. Por estas razões é normal

que as plantas não se desenvolvam todas da mesma forma, apesar de estarem no mesmo ambiente e por isso provocarem alterações diferentes nas comunidades microbianas. Como exemplo, em alguns casos as plantas secaram e por isso são normais as grandes diferenças encontradas. Nas amostras de sedimento, as diferenças encontradas podem dever-se a deficiências nutricionais ou a transformações do mercúrio.

Finalmente, fazendo uma comparação final entre todas as amostras, o dendrograma da Figura 18 mostra um afastamento total das amostras S T0 e P T0, das amostras dos outros tempos de exposição, tal como já tinha sido previsto pelos dendrogramas já discutidos. Estas amostras efetivamente apresentam grande similaridade entre elas sem serem sequer distintos os tipos de sedimento S e P. É por isso fiável afirmar que ambas amostras partiram no geral do mesmo tipo de comunidades microbianas e divergiram após serem aplicados os diferentes fatores, o tempo de incubação e a planta. Quanto às amostras T1 e T2, estas agruparam-se segundo o tipo de sedimento onde se encontravam. É visível num dos ramos aproximação das amostras S T1 e S T2 de 13% e de P T1 e P T2 de 33%. Olhando para os valores das amostras S, estas dividem-se perfeitamente em dois grupos conforme o tempo de exposição, com bastante similaridade entre eles. Para S T2 as amostras são 28% similares enquanto para o S T1 são 59%. Tendo em conta que as amostras de tempo 0 têm percentagens de similaridade muito elevadas, quanto menor a similaridade entre as amostras dos outros tempos, maior ação de agentes externos sofreu a amostra. Neste caso as amostras S T2 são menos similares que as amostras S T1, logo o tempo de incubação provoca a divergência destas comunidades microbianas.

Da mesma forma, olhando para os valores de similaridade das amostras P T1 e P T2, é óbvia a ação da rizosfera na comunidade bacteriana. Isto porque nas amostras P não há uma perfeita divisão das amostras T1 e T2 com as respetivas percentagens de aproximação de cada um dos ramos como nas amostras S. Assim, as comunidades microbianas nestas condições sofreram a ação da incubação tal como as amostras S mas sofreram muito mais a ação da planta daí esta aproximação maior de 33% e a não divisão conforme os tempos de exposição.

Tendo em conta estes valores é seguro afirmar que o tipo de sedimento afeta mais a comunidade microbiana do que o tempo de incubação. Isto era previsível, mais uma vez pelo fato da rizosfera produzir exsudados radiculares que permitem diretamente uma modificação da comunidade microbiana associada, levando à sobrevivência ou extinção de microrganismos associados. Por outro lado, a planta também exerce uma ação indireta sobre estas comunidades por alteração das formas de mercúrio existentes no sedimento, como a formação de metilmercúrio, e conseqüentemente também nas comunidades microbianas.

4.3. Diversidade e equitabilidade

Têm sido propostos muitos índices de diversidade biológica, alguns dos quais incorporam tanto o conceito de riqueza em espécies como o de equitabilidade. As variações desses índices para várias amostras da mesma população, ao longo do tempo, dão indicações sobre alterações na estrutura da população (dinâmica das populações)^[103]. Por outro lado, a comparação dos valores do mesmo índice para populações em condições diferentes, permite averiguar como os fatores ambientais influenciam a estrutura das populações^[103], o que acontece neste trabalho quando abordado o tempo de incubação em microcosmos e a presença ou não de planta. Fazendo uma correspondência com os resultados obtidos, a diversidade das amostras é elevada uma vez que todos os perfis têm um elevado número de bandas, considerando bandas mais e menos intensas. Por visualização dos géis de DGGE e por análise dos dendrogramas obtidos, as amostras T0 são as amostras mais homogêneas em termos número e intensidade de bandas.

Nas amostras T0 há elevada reprodutibilidade entre réplicas a, b e c e é onde existe maior reprodutibilidade entre os diferentes microcosmos, principalmente nas amostras T0 S. As réplicas a, b e c de cada microcosmo têm uma similaridade elevada e por isso seria de esperar índices de Shannon-Weaver muito semelhantes. Nas amostras S (S1 a S5) isso acontece, notando-se no gráfico respetivo (Gráfico 2). Nas amostras T0 P, apesar de nos dendrogramas aparentemente terem elevada similaridade, já não é tão linear como nas amostras T0 S. As amostras T0 P não estiveram muito tempo em

incubação mas o índice de Shannon-Weaver demonstra algumas diferenças quando comparados os índices dos diferentes microcosmos. Apesar de até aqui se falar sempre em similaridade elevada nas amostras do tempo 0, o índice de Shannon-Weaver mostra que há ligeiras diferenças nas amostras de rizosfera e por isso já há algumas alterações provocadas pela planta nestas comunidades.

Graficamente, visualizando o índice de Shannon-Weaver resultante de amostras de rizosfera e de sedimento, pode salientar-se uma diferença entre microcosmos com tempos de incubação iguais, mais notório nas amostras P. Apesar disso, os resultados obtidos vão ao encontro do esperado, ou seja, nas amostras de rizosfera, as comunidades têm uma diversidade maior. Foi nas amostras T1 P onde os índices foram mais elevados, talvez por nesse tempo as comunidades terem sentido as maiores mudanças relativamente à rizosfera. No T2 P a diversidade não é tão elevada porque entretanto terão desaparecido grupos ainda existentes no tempo 1 e que no tempo 2 já não existem. Estas comunidades microbianas sofrem o efeito da planta e indiretamente sofrem o efeito do mercúrio transformado ou acumulado por esta. Nas amostras de sedimento, a diversidade diminui muito no tempo T1 S relativamente às amostras T0 porque, contrariamente às amostras de rizosfera, é neste tempo que provavelmente há menor quantidade de nutrientes e só alguns filótipos conseguem manter-se. Nas amostras T2 S as comunidades têm uma diminuição da diversidade menor do que as amostras T1, no entanto ela existe. Esta diminuição é normal pelos fatos já apresentados, mas há uma maior adaptação da comunidade ao sedimento mais pobre em nutrientes, daí o aumento relativamente às amostras T1 S.

Com o aumento do tempo de incubação e o efeito da planta é nítido o aparecimento de bandas com muito forte intensidade correspondentes a frações bacterianas que foram beneficiadas nestas condições. Por essa razão é normal o índice de equitabilidade ser inferior quando estas alterações mais se fazem sentir, ou seja no tempo 1. No tempo 2 as comunidades parecem já estar adaptadas aos respetivos ambientes e por isso o índice de equitabilidade não é muito diferente do obtido no tempo 1. O índice de Shannon-Weaver é relativamente elevado, havendo no entanto um aumento do seu valor nas amostras T1, relativamente às T0 em amostras P. Como

normalmente há mais nutrientes disponíveis nas rizosferas do que nos sedimentos, as comunidades microbianas dos sedimentos possuem uma diversidade e abundância menor de microrganismos^[99, 104]. Mais uma vez, a adaptação das amostras P no tempo 1 relativamente ao excesso de nutrientes resume-se num aumento da diversidade enquanto as amostras S diminuem este índice pelas razões contrárias. No geral, estes índices são um complemento aos dados já obtidos pelas visualizações e análises anteriores e mostram um elevado efeito da planta nas comunidades da rizosfera. Por outro lado, os índices de equitabilidade mostram o que é visível nos géis de DGGE, ou seja, um maior número de bandas intensas nas amostras T1 e T2 relativamente às amostras 0, diminuindo o valor destes índices nos primeiros.

Este estudo é vantajoso na medida em que isola apenas um fator, a presença ou ausência da planta. Assim, as conclusões deste trabalho permitirão dar um contributo mais importante a esta problemática do que estudos que incluem diversos fatores. Por outro lado, pode ser desvantajoso uma vez que estudos ambientais são fortemente influenciados por fatores externos. Apesar disso, os resultados são coerentes e permitem que sejam retiradas algumas conclusões.

5. Conclusões

5.1. Conclusões

O principal objetivo deste trabalho era avaliar a estrutura e dinâmica de comunidades bacterianas de sedimentos contaminados com mercúrio na presença e na ausência de plantas. Este objetivo foi cumprido através dos resultados obtidos como os géis de DGGE, dendrogramas de similaridade e índices de diversidade e equitabilidade de sedimentos com e sem planta.

Os dados apresentados nesta dissertação contribuem para uma melhor compreensão das modificações que acontecem nas comunidades microbianas. Relativamente à sua estrutura, as comunidades são diferentes estruturalmente quando em sedimentos com planta. O fato de na rizosfera existirem condições que não existem em sedimento sem rizosfera permite a identificação das modificações encontradas.

Quanto à dinâmica da comunidade microbiana, pela análise dos índices calculados, estas comunidades estão em mudança ao longo dos tempos de incubação analisados e há um elevado número de frações dominantes que se destacam quer em rizosfera, quer em amostras T2. Pela análise dos dendrogramas e dos índices de diversidade é possível afirmar que a rizosfera tem um efeito elevado nas comunidades microbianas e este sobrepõe-se ao efeito do mercúrio.

Em conclusão, a diversidade e equitabilidade das comunidades microbianas de sedimentos contaminados com mercúrio são alteradas ao longo do tempo de incubação, provavelmente por transformações da forma de mercúrio presente nos sedimentos. Quando associados à rizosfera, estas comunidades microbianas sofrem alterações mais acentuadas em termos de estrutura e dinâmica devido a condições aí fornecidas pela planta.

6. Perspetivas futuras

6.1. Atualidade

Atualmente há uma preocupação crescente com a remediação de problemas relacionados com a poluição e, mais especificamente com o mercúrio uma vez que este existe em elevadas quantidades no ambiente e é muito tóxico. É apresentada na Figura 19 um exemplo de um estudo utilizando uma estirpe transgénica para técnicas de biorremediação de sistemas contaminados.

Grupos resistentes futuramente identificados neste trabalho poderão ser utilizados para este fim.

CiênciaHoje[®] Quinta-feira, 27 de Outubro de 2011

Jornal de Ciência, Tecnologia e Empreendedorismo
Diretor: Jorge Massada
Subdiretores: Raquel Soares e Tiago Fleming Outeiro

Home Ciéncias Revista Dossiers Colunistas Encartes Utilidades Quem som

E. coli transgénica poderá limpar água com mercúrio

Bactérias poderão ser alternativa a dispendiosas técnicas de descontaminação
2011-08-19



O mercúrio é muito tóxico.

Segundo um [estudo da Universidade Interamericana de Porto Rico](#), bactérias transgénicas, que suportam altas doses de mercúrio, poderiam ser a solução para limpar áreas contaminadas com este metal.

O investigador Oscar Ruiz e os seus colegas consideram que as bactérias transgénicas criadas por eles em laboratório poderão ser uma alternativa às custosas técnicas de descontaminação adoptadas actualmente. Recorde-se que o mercúrio, que pode entrar na cadeia alimentar, é muito tóxico, sobretudo na forma de metilmercúrio, para humanos e animais.

Estes organismos unicelulares são capazes de proliferar numa solução com 24 vezes mais a dose mortal de mercúrio para bactérias não resistentes. Os organismos transgénicos conseguiram absorver em cinco dias 80 por cento do mercúrio contido no líquido, segundo estudo publicado na [BMC Biotechnology](#).

A Escherichia coli tornou-se resistente a altas concentrações de mercúrio, graças à inserção de um gene que permite a produção de metalotioneína, proteína que desempenha um papel de desintoxicante no organismo de ratos. As bactérias transgénicas demonstraram, no estudo, serem capazes de extrair mercúrio de um líquido e este poderá ser utilizado em novas aplicações industriais

Figura 19: Notícia recente acerca da temática estudada.

6.2. Continuação futura do trabalho

Este trabalho não culmina apenas em respostas, havendo questões que permanecem inevitavelmente por responder. Em trabalhos futuros será importante direcionar esforços no sentido de saber especificamente que comunidades microbianas são estas que parecem ser resistentes ao mercúrio e que se desenvolvem especialmente na rizosfera de plantas.

Como estratégia futura, a construção de bibliotecas de DNA de forma a conseguir abranger o maior número de sequências de rDNA seria uma boa opção para exibir os grupos mais destacados nestes ambientes. Posteriormente esta informação poderia ser utilizada também em processos de biorremediação, pela identificação de estirpes resistentes ao mercúrio.

Há cada vez mais uma necessidade de estudar a diversidade taxonómica de grupos provenientes de ambientes alterados por fatores ambientais ou antropogénicos. Este esclarecimento traria vantagens pois estes microrganismos poderão ser possíveis indicadores de contaminações mais sensíveis do que a maioria e poderão ser úteis na classificação da contaminação. Isto acontece pois a diversidade pode ser afetada rapidamente em função de stresses no ecossistema. Em conjunto com a planta, estas comunidades poderiam constituir uma boa metodologia na recuperação de sistemas estuarinos contaminados com mercúrio.

7. Bibliografia

1. Boening, D. W., Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere* **2000**, *40* (12), 1335-1351.
2. Gray, J. E.; Hines, M. E., Mercury: Distribution, transport, and geochemical and microbial transformations from natural and anthropogenic sources. *Applied Geochemistry* **2006**, *21* (11), 1819-1820.
3. Mason, R. P.; Fitzgerald, W. F.; Morel, F. M. M., The biogeochemical cycling of elemental mercury: Anthropogenic influences. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1994**, *58* (15), 3191-3198.
4. Rajar, R., Zagar, D., Cetina, M., Akagi, H., Yano, S., Tomiyasu, T., Horvat, M., Application of three-dimensional mercury cycling model to coastal seas. *Ecological Modelling* **2004**, *171* (1-2), 139-155.
5. WHO, Methylmercury. *Environmental Health Criteria* **1990**.
6. Whalin, L., Kim, E., Mason, R., Factors influencing the oxidation, reduction, methylation and demethylation of mercury species in coastal waters. *Marine Chemistry* **2007**, *107* (3), 278-294.
7. Morel, F., Kraepiel, A., Amyot, M., The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1998**, *29* (ArticleType: research-article / Full publication date: 1998 / Copyright © 1998 Annual Reviews), 543-566.
8. Canada, E. C. a. H., Risk Management Strategy for Mercury. *Environment Canada and Health Canada* **2010**, 52.
9. Hines, N. A.; Brezonik, P. L., Mercury dynamics in a small Northern Minnesota lake: water to air exchange and photoreactions of mercury. *Marine Chemistry* **2004**, *90* (1-4), 137-149.
10. Válega, M. S. G. A. Mobilidade, acumulação e transformação do mercúrio em sapais. Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, Aveiro, **2009**.
11. Chrystall, L., Rumsby, A. *Mercury Inventory for New Zealand 2008*; **2009**.
12. Alexandre, D. C. S. Avaliação de área contaminada por mercúrio total a descoberto. Pós Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais Brasil, **2006**.
13. Bisinoti, C. M. Produção de Hg orgânico em sedimentos tropicais a partir de Hg⁰: Experimentos em microcosmos. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, **2002**.
14. Rodriguez, M., Tessier, E., Amouroux, D., Guyoneaud, R., Duran, R., Caumette, P., Donard, O., Mercury methylation/demethylation and volatilization pathways in estuarine sediment slurries using species-specific enriched stable isotopes. *Marine Chemistry* **2004**, *90* (1-4), 107-123.
15. Horvat, M., Covelli, S., Faganeli, J., Logar, M., Mandic, V., Rajar, R., Sirca, A., Zagar, D., Mercury in contaminated coastal environments; a case study: the Gulf of Trieste. *The Science of The Total Environment* **1999**, *237-238*, 43-56.
16. Tomiyasu, T., Matsuyama, A., Eguchi, T., Fuchigami, Y., Oki, K., Horvat, M., Rajar, R., Akagi, H., Spatial variations of mercury in sediment of Minamata Bay, Japan. *Science of The Total Environment* **2006**, *368* (1), 283-290.
17. Amorim, M., Mergler, D., Bahia, M., Dubeau, H., Miranda, D., Lebel, J., Burbano, R., Lucotte, M., Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **2000**, *72*, 497-507.

18. Roulet, M., Lucotte, M., Saint-Aubin, A., Tran, S., Rhéault, I., Farella, N., De Jesus Da Silva, E., Dezencourt, J., Sousa Passos, C., Soares, G., Guimarães, J., Mergler, D., Amorim, M., The geochemistry of mercury in central Amazonian soils developed on the Alter-do-Chão formation of the lower Tapajós River Valley, Pará state, Brazil. *The Science of The Total Environment* **1998**, *223* (1), 1-24.
19. Miranda, R., Coelho, S. A., Guimarães, J., Correia, R., Oliveira, D., Mercúrio em sistemas aquáticos: factores ambientais que afectam a metilação *Oecologia Brasiliensis* **2007**, *11* (2).
20. Reis, A. Impacto do mercúrio na saúde humana: Aveiro como caso de estudo. Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, **2008**.
21. Válega, M., Lillebø, A. I., Pereira, M. E., Duarte, A. C., Pardal, M. A., Long-term effects of mercury in a salt marsh: Hysteresis in the distribution of vegetation following recovery from contamination. *Chemosphere* **2008**, *71* (4), 765-772.
22. Williams, T. P.; Bubb, J. M.; Lester, J. N., Metal accumulation within salt marsh environments: A review. *Marine Pollution Bulletin* **1994**, *28* (5), 277-290.
23. Zhu, X., *Guidelines for the bioremediation of oil-contaminated salt marshes*. United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Risk Management Research Laboratory: Cincinnati, **2004**.
24. Carvalho, A. R. C. Mecanismos de resposta a mercúrio em plantas de sapal. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, **2009**.
25. Caçador, I., Vale, C., Catarino, F., Accumulation of Zn, Pb, Cu, Cr and Ni in sediments between roots of the Tagus estuary salt marshes, Portugal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **1996**, *42* (3), 393-403.
26. Bouchard, V., Creach, V., Lefeuvre, J., Bertru, G., Mariotti, A., Fate of plant detritus in a European salt marsh dominated by *Atriplex portulacoides* (L.) Aellen. *Hydrobiologia* **1998**, *373-374*, 75-87.
27. Cunha, M. A.; Pedro, R.; Almeida, M. A.; Silva, M. H., Activity and growth efficiency of heterotrophic bacteria in a salt marsh (Ria de Aveiro, Portugal). *Microbiological Research* **2005**, *160* (3), 279-290.
28. Silva, F., J., Duck, R. W., Catarino, J. B., Nutrient retention in the sediments and the submerged aquatic vegetation of the coastal lagoon of the Ria de Aveiro, Portugal. *Journal of Sea Research* **2009**, *62* (4), 276-285.
29. Válega, M., Lillebø, A. I., Caçador, I., Pereira, M. E., Duarte, A. C., Pardal, M. A., Mercury mobility in a salt marsh colonised by *Halimione portulacoides*. *Chemosphere* **2008**, *72* (10), 1607-1613.
30. Santos, F. S., Sobrinho, N. M. B. A., Mazur N., Garbisu, C., Barrutia O., Becerril J. M., Resposta Antioxidante, formação de fitoquelatinas e composição d pigmentos fotoprotectores em *Brachiaria decumbens* Stapf submetida a contaminação com Cd e Zn. *Química Nova* **2011**, *34* (1), 16-20.
31. Válega, M., Lillebø, A. I., Pereira, M. E., Caçador, I., Duarte, A. C., Mercury in salt marshes ecosystems: *Halimione portulacoides* as biomonitor. *Chemosphere* **2008**, *73* (8), 1224-1229.
32. Sousa, A., Caçador, I., Lillebø, A., Pardal, M., Heavy metal accumulation in *Halimione portulacoides*: Intra- and extra-cellular metal binding sites. *Chemosphere* **2008**, *70* (5), 850-857.

33. Rauser, W., Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochemistry and Biophysics* **1999**, *31* (1), 19-48.
34. Cobbett, C.; Goldsbrough, P., Phytochelatins and metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* **2002**, *53* (1), 159-182.
35. Válega, M., Lima, A., Figueira, E., Pereira, E., Pardal, M., Duarte, A., Mercury intracellular partitioning and chelation in a salt marsh plant, *Halimione portulacoides* (L.) Aellen: Strategies underlying tolerance in environmental exposure. *Chemosphere* **2009**, *74* (4), 530-536.
36. Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., Sharma, A., Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany* **2004**, *52* (3), 199-223.
37. Reboreda, R.; Caçador, I., Halophyte vegetation influences in salt marsh retention capacity for heavy metals. *Environmental Pollution* **2007**, *146* (1), 147-154.
38. Pereira, P., Caçador, I., Vale, C., Caetano, M., Costa, A., Decomposition of belowground litter and metal dynamics in salt marshes (Tagus Estuary, Portugal). *Science of The Total Environment* **2007**, *380* (1-3), 93-101.
39. Markert, B., Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2007**, *21*, 77-82.
40. Melville, F.; Pulkownik, A., Investigation of mangrove macroalgae as bioindicators of estuarine contamination. *Marine Pollution Bulletin* **2006**, *52* (10), 1260-1269.
41. Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G., Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *606* (2), 135-150.
42. Ferrat, L., Martini, P. C., Roméo, M., Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquatic Toxicology* **2003**, *65* (2), 187-204.
43. Hassen, A., Jedidi, N., Cherif, M., M'Hiri, A., Boudabous, A., van Cleemput, O., Mineralization of nitrogen in a clayey loamy soil amended with organic wastes enriched with Zn, Cu and Cd. *Bioresource Technology* **1998**, *64* (1), 39-45.
44. Pinto, M. Bases Moleculares da Resistência ao Mercúrio em Bacérias Gram-Negativas da Amazônia Brasileira. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém-Pará, **2003**.
45. Lavrado, J. Distribuição e reactividade de mercúrio em sedimentos do estuário do Tejo. Relatório de Estágio profissionalizante, Universidade de Lisboa, Lisboa, **2003**.
46. Callister, S., Winfrey, M., Microbial methylation of mercury in upper Wisconsin river sediments. *Water, Air, and Soil Pollution* **1986**, *29* (4), 453-465.
47. Compeau, G.; Bartha, R., Methylation and demethylation of mercury under controlled redox, pH and salinity conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **1984**, *48* (6), 1203-1207.
48. Kerin, E., Gilmour, C., Roden, E., Suzuki, M., Coates, J., Mason, R., Mercury Methylation by Dissimilatory Iron-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **2006**, *72* (12), 7919-7921.

49. Jay, J., Murray, K., Gilmour, C., Mason, R., Morel, F., Roberts, A., Hemond, H., Mercury Methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 in the Presence of Polysulfides. *Applied and Environmental Microbiology* **2002**, *68* (11), 5741-5745.
50. Oliveira, A., Pampulha, M., Neto, M., Almeida, A., Mercury tolerant diazotrophic bacteria in a long-term contaminated soil. *Geoderma* **2010**, *154* (3-4), 359-363.
51. Nascimento, A., Souza, E., Operon mer: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genetics and Molecular Research* **2003**, *2* (1), 92-101.
52. Hobman, J. L., Essa, A. M. M., Brown, N. L. , Mercury resistance (mer) operons in enterobacteria. *Biometals*, Ed. London, **2002**.
53. Shee, N., Belinda, D., Enzo, P., Mrinal, B., A Tn5051-like mer-containing transposon identified in a heavy metal tolerant strain *Achromobacter* sp. AO22. *BMC Research Notes* **2009**, *2* (1), 38.
54. Schelert, J., Dixit, V., Hoang, V., Simbahan, J., Drozda, M., Blum, P., Occurrence and characterization of mercury resistance in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* by use of gene disruption. *Journal of Bacteriology* **2004**, *186* (2), 427-437.
55. Liebert, C., Wireman, J., Smith, T., Summers, A., Phylogeny of mercury resistance (mer) operons of gram-negative bacteria isolated from the fecal flora of primates. *Applied and Environmental Microbiology* **1997**, *63* (3), 1066-1076.
56. Møller, A. K. Bacterial reduction of mercury in the high arctic Ph. D. Dissertation, University of Copenhagen, **2010**.
57. Belliveau, B. H., Trevors, J. T., Mercury resistance and detoxification in bacteria. *Applied Organometallic Chemistry* **1989**, *3* (4), 283-294.
58. Barkay, T., Fouts, D. L., Olson, B. H., Preparation of a DNA gene probe for detection of mercury resistance genes in gram-negative bacterial communities. *Applied and environmental microbiology* **1985**, *49* (3), 686-92.
59. Ghosh, S., Sadhukhan, P. C., Ghosh, D. K., Chaudhuri, J., Mandal, A., Volatilization of Mercury by Resting Mercury-Resistant Bacterial Cells. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **1996**, *56* (2), 259-264.
60. Hall, B., Distribution of mercury resistance among *Staphylococcus aureus* isolated from a hospital community. *Journal of Hygiene* **1970**, *68*, 111-119.
61. Tonomura, K., Maeda, K., Futai, F., Nakagami, T., Yamada, M., Stimulative Vaporization of Phenylmercuric Acetate by Mercury-resistant Bacteria. *Nature* **1968**, *217* (5129), 644-646.
62. Ravel, J., Amoroso, M. J., Colwell, R. R.; Hill, R. T., Mercury-resistant actinomycetes from the Chesapeake Bay. *FEMS Microbiology Letters* **1998**, *162* (1), 177-184.
63. Xiao-xi, Z., Jian-xin T., Pei J., Hong-wei L., Zhi-min D., Xue-duan L., Isolation, characterization and extraction of mer gene of Hg²⁺ resisting strain D2. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* **2010**, *20* (3), 507-512.

64. Radford, A. J. O., Kelly, W. J., Reaney, D. C., *Translocatable resistance to mercuric and phenylmercuric ions in soil bacteria*. **1981**; Vol. 147, p 1110-2.
65. Rochelle, P. A., Wetherbee, M. K., Olson, B. H., Distribution of DNA Sequences Encoding Narrow- and Broad-Spectrum Mercury Resistance. *Applied and Environmental Microbiology* **1991**, 57 (6), 1581-1589.
66. Nakamura, K., Sakamoto, M., Uchiyama, H., Yagi, O., Organomercurial-volatilizing bacteria in the mercury-polluted sediment of Minamata Bay, Japan. *Applied and environmental microbiology* **1990**, 56 (1), 304-5.
67. Jaysankar, D., Ramaiah, N., Characterization of marine bacteria highly resistant to mercury exhibiting multiple resistances to toxic chemicals. *Ecological Indicators* **2007**, 7 (3), 511-520.
68. Barkay, T., Wagner-D., I., Microbial Transformations of Mercury: Potentials, Challenges, and Achievements in Controlling Mercury Toxicity in the Environment. In *Advances in Applied Microbiology*, Laskin, A. I., Bennett, J. W., Geoffrey, M. G., Ed. Academic Press: **2005**; Vol. 57, pp 1-52.
69. Castro, H., Williams, N., Ogram, A., Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **2000**, 31 (1), 1-9.
70. Compeau, G. C., Bartha, R., Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied and environmental microbiology* **1985**, 50 (2), 498-502.
71. King, J., Kostka, J., Frischer, M., Saunders, F., Sulfate-Reducing Bacteria Methylate Mercury at Variable Rates in Pure Culture and in Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **2000**, 66 (6), 2430-2437.
72. Devereux, R., He, S., Doyle, C., Orkland, S., Stahl, D., LeGall, J., Whitman, W., Diversity and origin of Desulfovibrio species: phylogenetic definition of a family. *Journal of Bacteriology* **1990**, 172 (7), 3609-3619.
73. Sigel, A., Organometallics in Environment and Toxicology. In *Metal ions on life sciences*, Sigel A., S. H., Sigel R. K. O., Ed. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2011**; Vol. 7, pp 373-381.
74. Cardoso, E., Nogueira, M. A., A Rizosfera e seus Efeitos na Comunidade Icrobiana e na Nutrição de Plantas. In *Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental*, Silveira, A. P. D., Freitas S. D. S., Ed. IAC: Campinas, **2007**.
75. Heidelberg, J. F., Seshadri, R., Haveman, S. A., Hemme, C. L., Paulsen, I. T., Kolonay, James F., Eisen, J. A., Ward, N., Methe, B., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., Deboy, R. T., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Madupu, R., Nelson, W. C., Sullivan, S. A., Fouts, D., Haft, D. H., Selengut, J., Peterson, J. D., Davidsen, T. M., Zafar, N., Zhou, L., Radune, D., Dimitrov, G., Hance, M., Tran, K., Khouri, H., Gill, J., Utterback, T. R., Feldblyum, T. V., Wall, J. D., Voordouw, G., Fraser, C. M., The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Nature Biotechnology* **2004**, 22 (5), 554-559.
76. King, J., Kostka, J., Frischer, M., Saunders, F., Jahnke, R., A Quantitative Relationship that Demonstrates Mercury Methylation Rates in Marine Sediments Are Based on the Community Composition and Activity of Sulfate-Reducing Bacteria. *Environmental Science & Technology* **2001**, 35 (12), 2491-2496.
77. Cursino, L., Oberdá, S. M., Cecílio, R.V., Moreira, R. M., Souza, C. E., Nascimento, A. M. A. , Mercury concentration in the sediment at different gold prospecting sites along the Carmo stream, Minas Gerais,

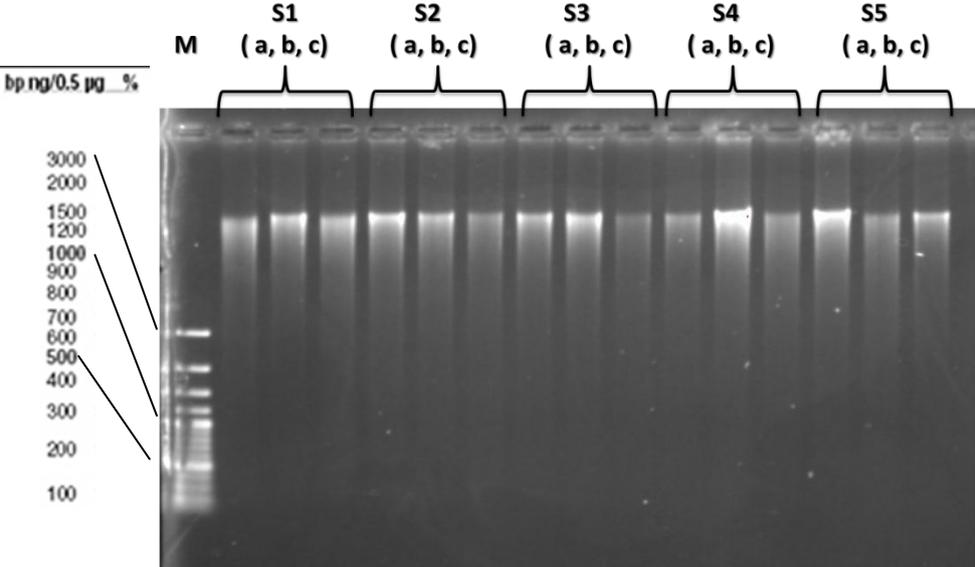
- Brazil, and frequency of resistant bacteria in the respective aquatic communities. *Hydrobiologia* **1999**, 394, 5-12.
78. Saouter, E., Turner, R, Barkay, T. , Microbial reduction of ionic mercury for the removal of mercury from contaminated environments. *The New York Academy of Sciences* **1994**, 721, 423-427.
79. Nascimento, A. M. A., Azevedo, M.O., Astolfi, S., Souza, C. E., Cloning of the mercuric-ion resistance operon into *Escherichia coli* 5K using the mini-plasmid technique. *Biotechnology techniques* **1992**, 6, 139-142.
80. Cursino, L., Mattos, S. V. M., Azevedo, V., Galarza, F., Bucker, D. H., Souza, C. E. and Nascimento, A.M.A. , Capacity of mercury volatilization by mer (from *Escherichia coli*) and glutathione S-transferase (from *Schistosoma mansoni*) genes cloned in *Escherichia coli*. *Science of the Total Environment* **2000**, 261, 109-113.
81. Rasmussena, L. D., Sùrensena, S.J., Turnerb, R.R. and Barkay, T. , Application of a mer-lux biosensor for estimating bioavailable mercury in soil. *Soil Biology & Biochemistry* **2000**, 32, 639-646.
82. Nautiyal, C. S., DasGupta S.M. , Screening of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In *Soil Biology: Advanced techniques in soil Microbiology*, Varma, A., Oelmuller, R., Ed. Springer: **2007**; Vol. 11.
83. Domingues, P. Isolation of Estuarine Biosurfactant-Producing Bacteria. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, **2011**.
84. Pereira, M., Lillebø, A. Pato, P. Válega, M., Coelho, J., Lopes, C., Rodrigues, S., Cachada, A., Otero, M., Pardal, M., Duarte, A., Mercury pollution in Ria de Aveiro (Portugal): a review of the system assessment. *Environmental Monitoring and Assessment* **2009**, 155 (1), 39-49.
85. Pereira, M. E., Duarte, A. C., Millward, G. E., Abreu, S. N., Vale, C., An estimation of industrial mercury stored in sediments of a confined area of the Lagoon of Aveiro (Portugal). *Water Science and Technology* **1998**, 37 (6-7), 125-130.
86. Pereira, E., Abreu, S. N., Coelho, J. P., Lopes, C. B., Pardal, M. A., Vale, C., Duarte, A. C., Seasonal fluctuations of tissue mercury contents in the European shore crab *Carcinus maenas* from low and high contamination areas (Ria de Aveiro, Portugal). *Marine Pollution Bulletin* **2006**, 52 (11), 1450-1457.
87. Mullis, K., The unusual origin of the polymerase chain reaction. . *Scientific American* **1990**, 56-65.
88. Shannon, C. E., Weaver, W. *The mathematical theory of communication*; IL:University of Illinois: 1963.
89. Pielou, E. C., *Ecological diversity* Wiley: New York, **1975**.
90. Ranjard, L.; Poly, F.; Nazaret, S., Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology* **2000**, 151 (3), 167-177.
91. Bull, A. T.; Ward, A. C.; Goodfellow, M., Search and discovery strategies for biotechnology: The paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2000**, 64 (3), 573-606.
92. Kirk, J. L.; Beaudette, L. A.; Hart, M.; Moutoglis, P.; Klironomos, J. N.; Lee, H.; Trevors, J. T., Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* **2004**, 58 (2), 169-188.

93. Rosado, A. S., Duarte, G. F. , Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TFGE) para estudar a diversidade microbiana. In *Recursos genéticos e melhoramento: microrganismos Jaguariúna* Melo, I. S., Ed. Embrapa meio ambiente: **2002**; pp 97-128.
94. Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A. C., Cacco, G., van Elsas, J. D., Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* **1999**, *38* (1-2), 1-15.
95. Maarit, N. R. H., I., Wallenius, K., Lindström, K., Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *Journal of Microbiological Methods* **2001**, *45* (3), 155-165.
96. Hiltner, L., Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arb. Deut. Landwirtsch. Ges.* **1904**, *98*, 59-78.
97. Dazzo, F. B., Ganter, S., Rhizosphere. In *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, Editor-in-Chief: Moselio, S., Ed. Academic Press: Oxford, **2009**; pp 335-349.
98. Cardoso, E. J. B. N., Nogueira , M.A., *A rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas*. SP: Instituto Agronômico: Campinas, **2007**.
99. Mukerji, K., Manoharachary, C., Singh, J. , *Microbial Activity in the Rhizosphere*: . Springer: Berlin Heidelberg, **2006**.
100. Raaijmakers, J., Paulitz, T., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moënne-Loccoz, Y., The Rhizosphere: A Playground and Battlefield for Soilborne Pathogens and Beneficial Microorganisms. *Plant and Soil* **2009**, *321*, 341-61.
101. Singh, G., Mukerji, K., Root Exudates as Determinant of Rhizospheric Microbial Biodiversity Microbial Activity in the Rhizosphere. Mukerji, K., Manoharachary, C., Singh, Jagjit, Ed. Springer Berlin Heidelberg: **2006**; Vol. 7, pp 39-53.
102. Almeida, C. M. R., Mucha, A. P., Vasconcelos, M.T.S.D., Influence of the Sea Rush *Juncus Maritimus* on Metal Concentration and Speciation in Estuarine Sediment Colonized by the Plant. . *Environmental Science & Technology*. **2004**, *38*:3112-8.
103. Fierer, N.; Jackson, R. B., The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103* (3), 626-631.
104. Ribeiro, H., Mucha, A., Almeida, C., Bordalo, A., Hydrocarbon degradation potential of salt marsh plant-microorganisms associations. *Biodegradation* **2011**, *22* (4), 729-739.

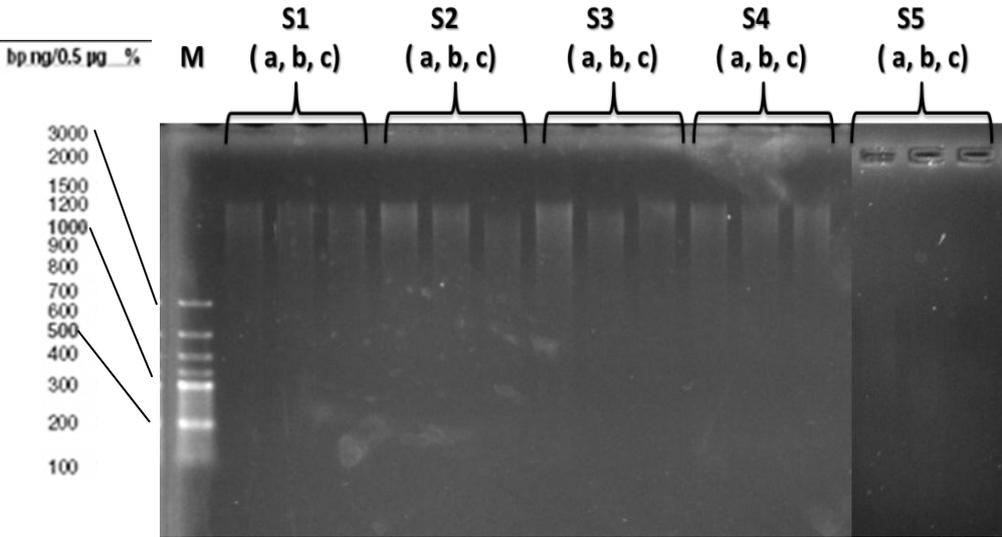
4. Anexos

Géis de agarose correspondentes a DNA total

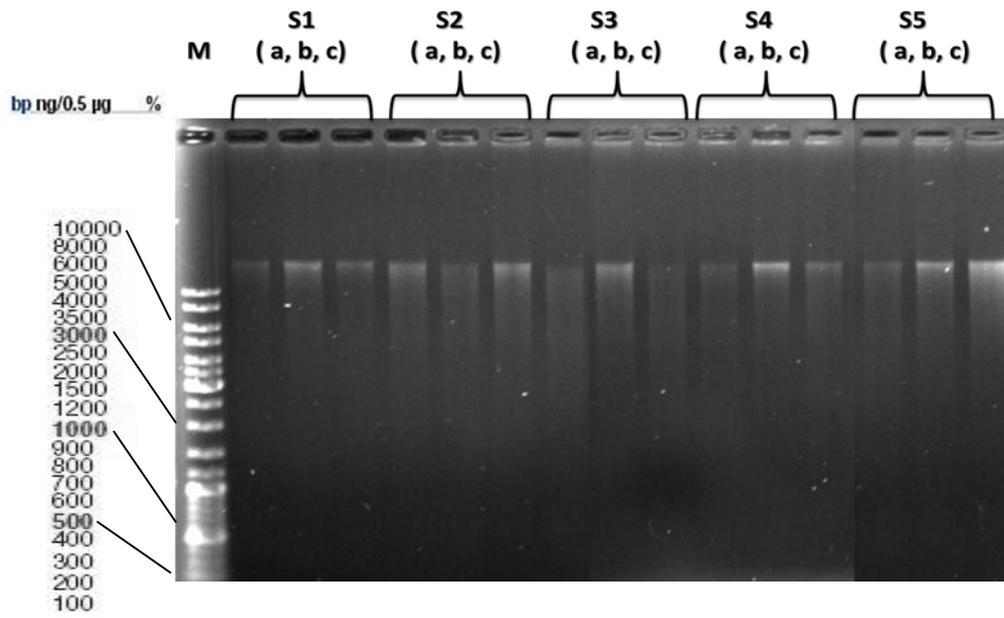
- Sedimento T0



- Sedimento T1

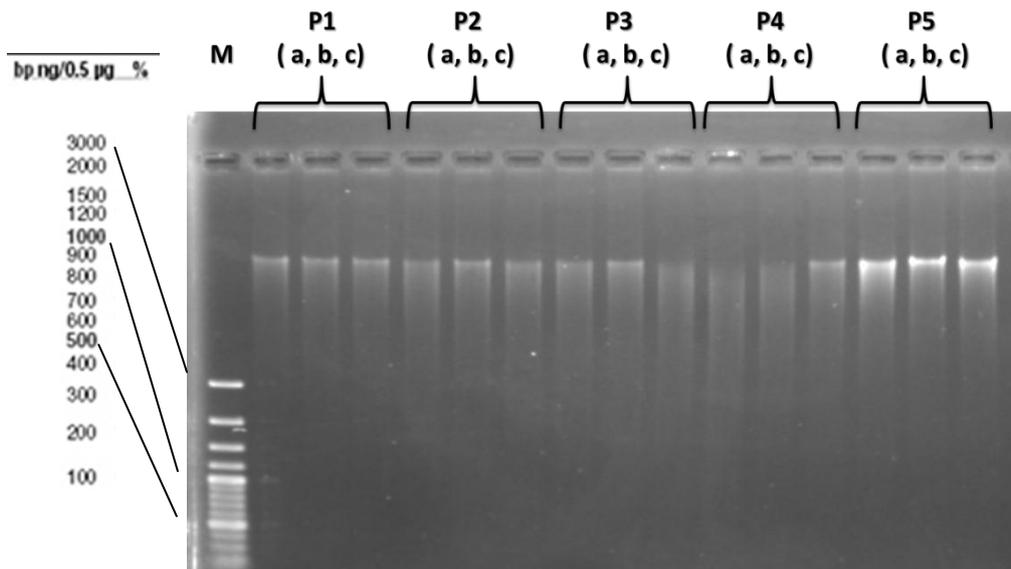


- Sedimento T2

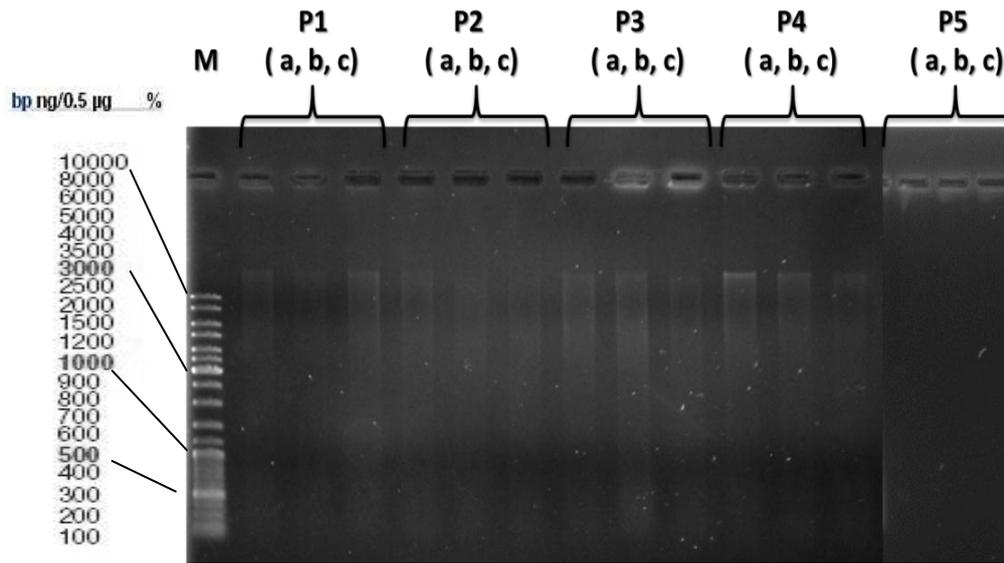


-

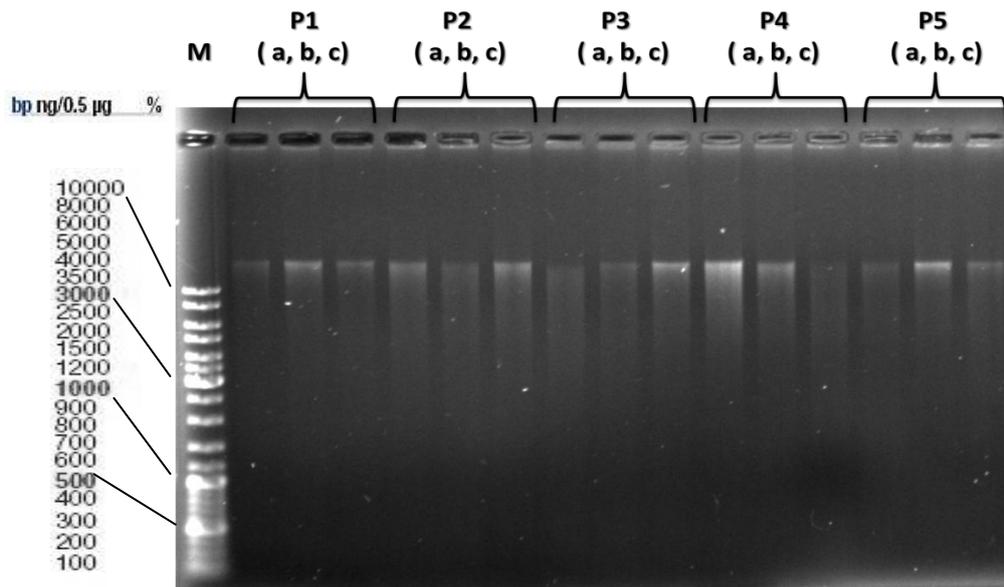
Planta T0



- Planta T1

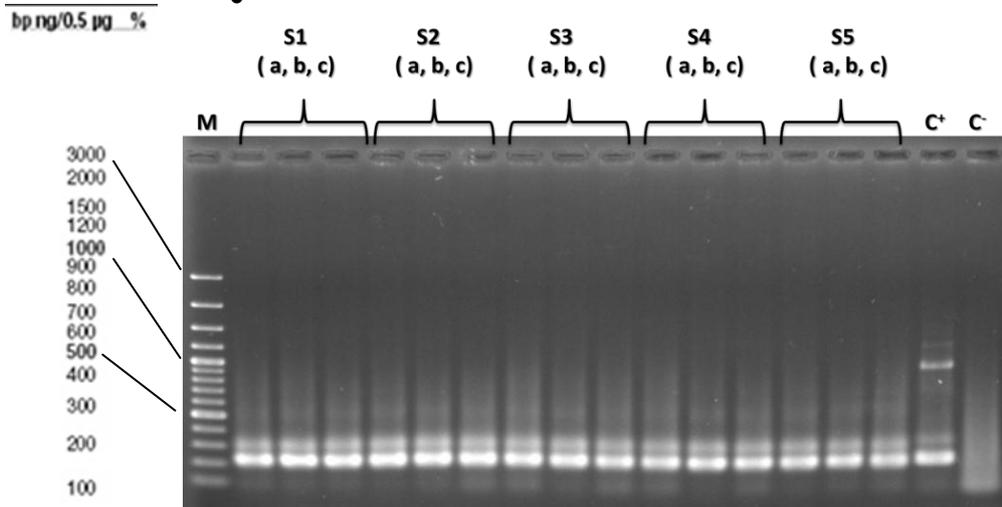


- Planta T2

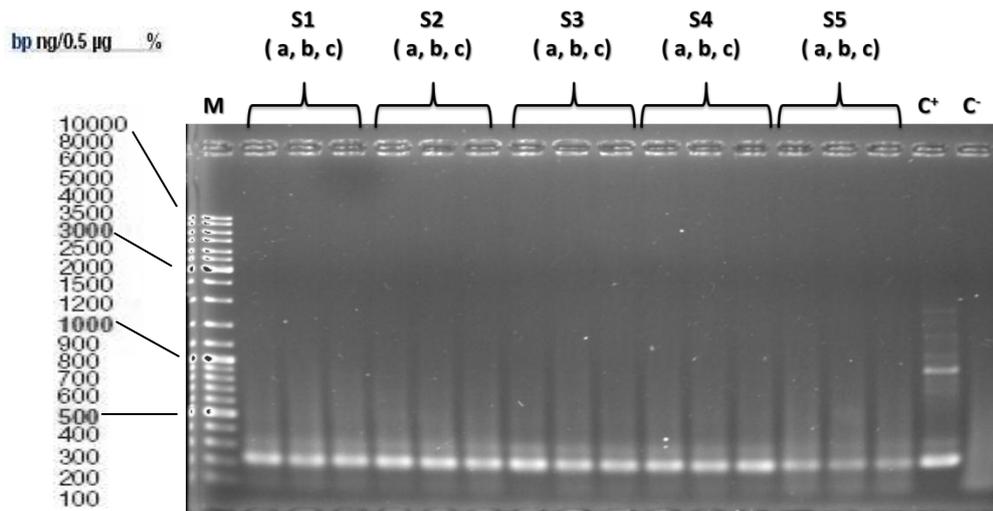


Géis de agarose correspondentes a rDNA 16S

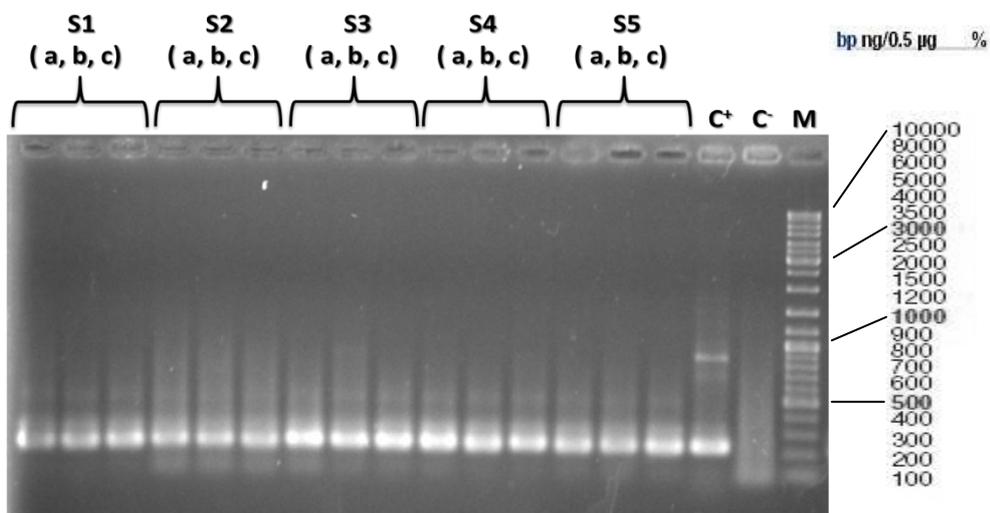
- Sedimento T0



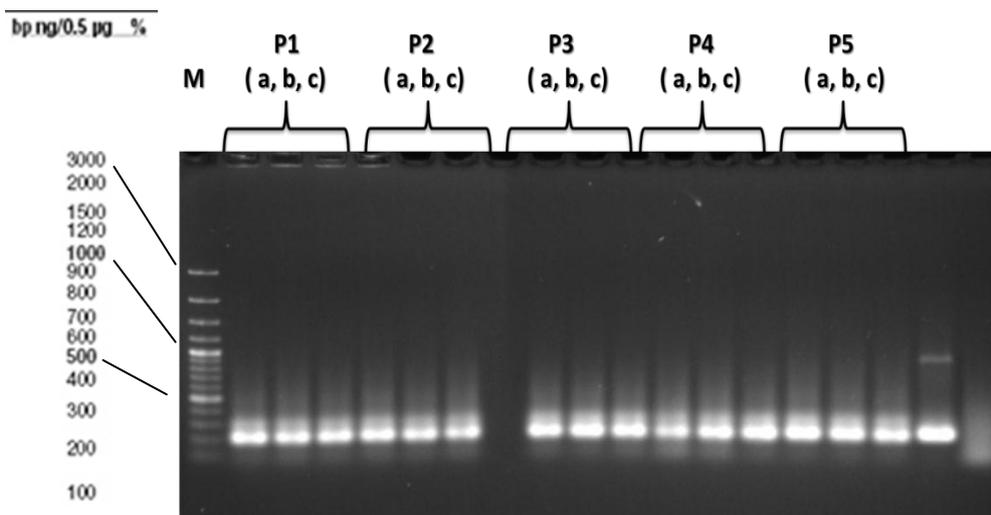
- Sedimento T1



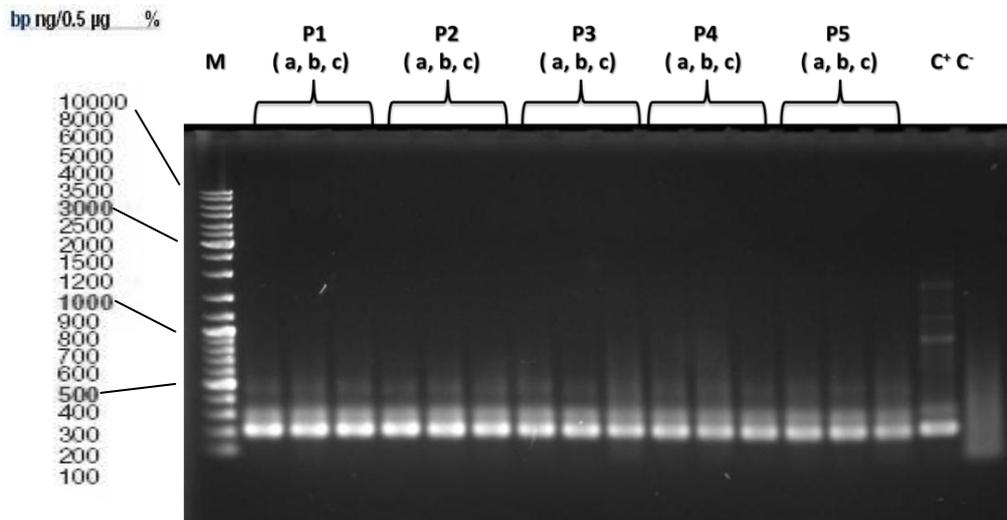
- Sedimento T2



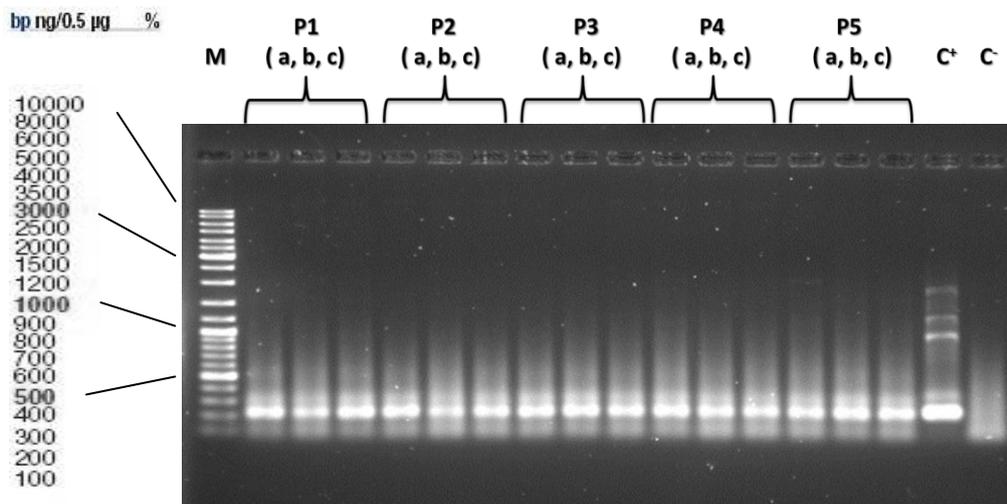
- Planta T0



- Planta T1

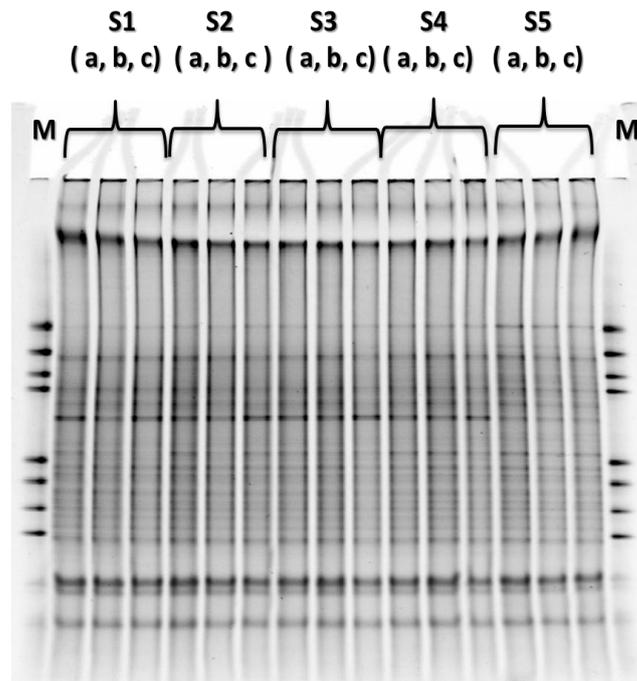


- Planta T2

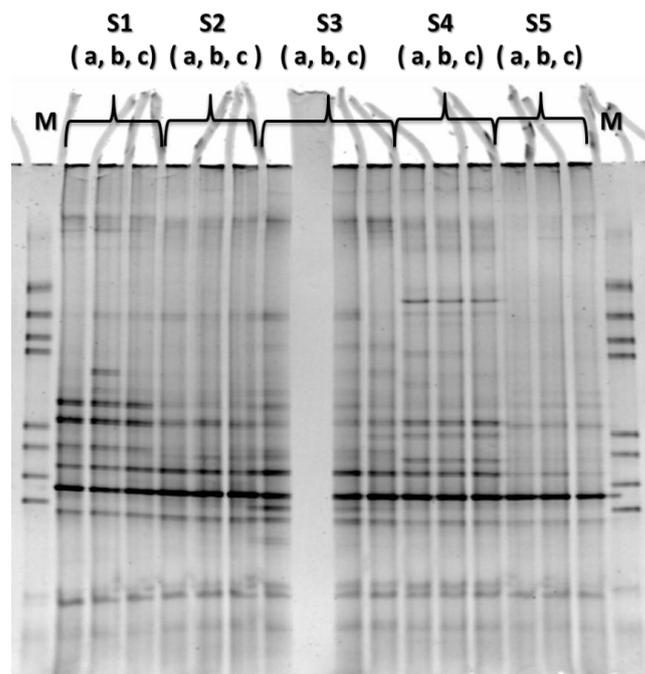


Géis de DGGE

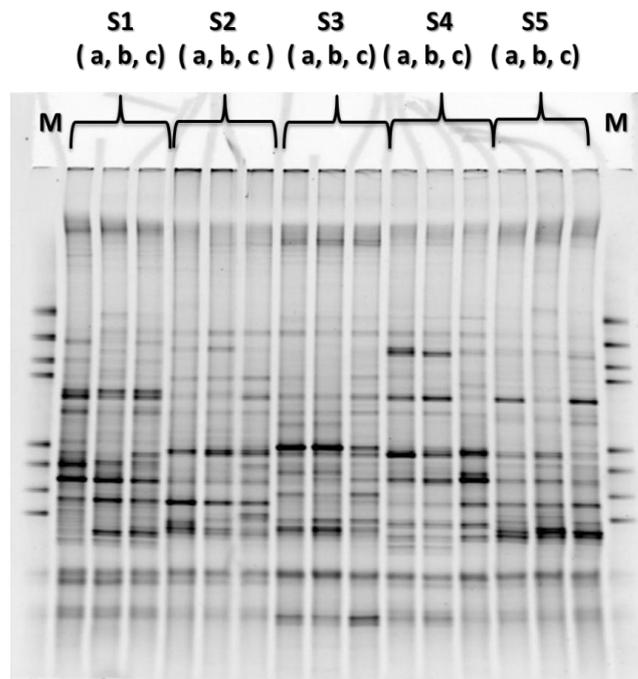
- Sedimento T0



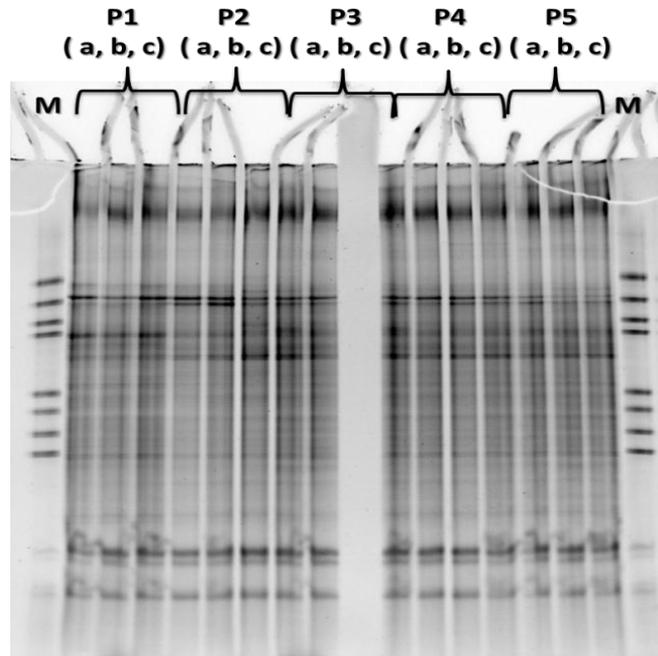
- Sedimento T1



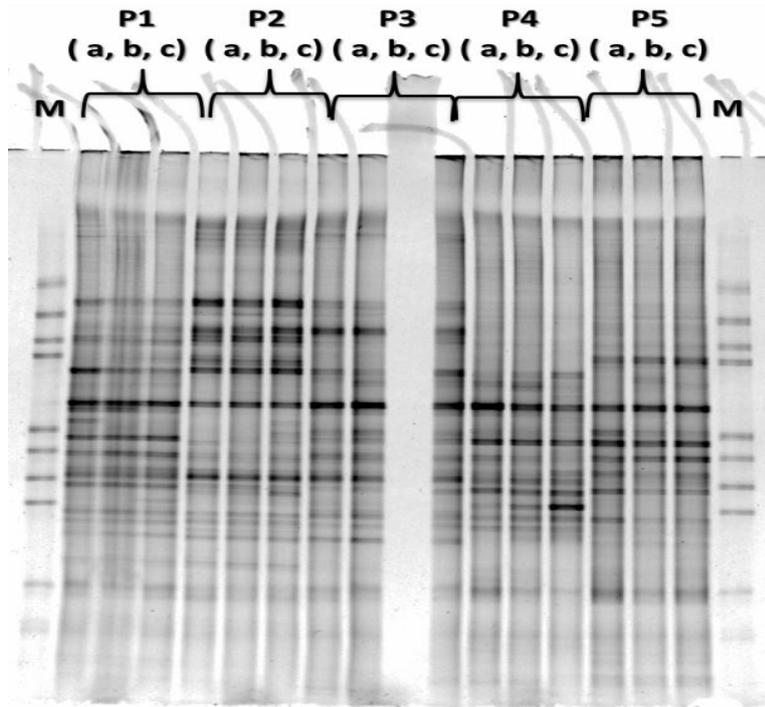
- Sedimento T2



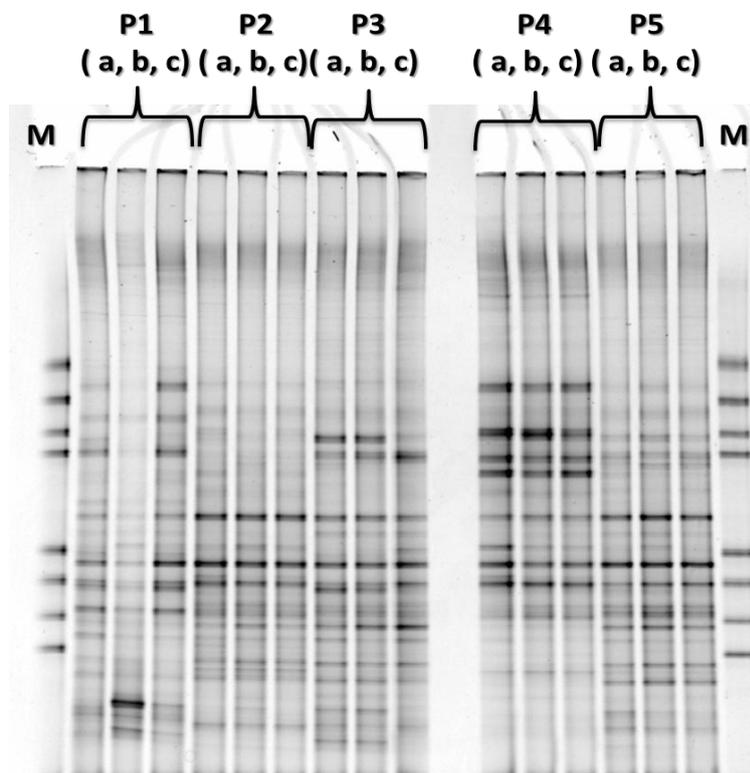
- Planta T0



- Planta T1



- Planta T2



Índice de Shannon-Weaver (H):

T0	1 (a)	1 (b)	1 (c)	2(a)	2 (b)	2 (c)	3 (a)	3 (b)	3 (c)	4 (a)	4 (b)	4 (c)	5 (a)	5 (b)	5 (c)
Planta, H	0,9082	0,9281	1,0156	0,8579	0,9882	1,0163	1,0177	1,1202	1,0257	0,9795	1,0015	1,0614	1,0232	1,0274	0,9849
Média do H das réplicas		0,9082			0,9541			1,0545			1,0141			1,0118	
Desvio padrão		0,0571			0,0845			0,0570			0,0424			0,0235	
Sedimento, H	1,1986	1,2109	1,2006	1,2156	1,1815	1,2008	1,2305	1,1851	1,1470	1,2060	1,2096	1,1897	1,2123	1,1838	1,1833
Média do H das réplicas		1,2034			1,1993			1,1875			1,2018			1,1931	
Desvio padrão		0,0066			0,0171			0,0418			0,0106			0,0166	

T1	1 (a)	1 (b)	1 (c)	2(a)	2 (b)	2 (c)	3 (a)	3 (b)	3 (c)	4 (a)	4 (b)	4 (c)	5 (a)	5 (b)	5 (c)
Planta, H	1,1212	1,0995	1,0634	1,2252	1,2177	1,2321	1,1901	1,2136	1,2025	1,0771	1,0220	1,0141	1,0784	0,9924	1,0938
Média do H das réplicas		1,0947			1,2250			1,2021			1,0377			1,0549	
Desvio padrão		0,0292			0,0072			0,0117			0,0343			0,0546	
Sedimento, H	0,8299	0,9056	0,8466	0,7851	0,7922	0,8532	0,9149	0,9280	0,9670	0,9625	0,8920	0,8881	0,5557	0,6952	0,5741
Média do H das réplicas		0,8607			0,8101			0,9366			0,9142			0,6083	
Desvio padrão		0,0398			0,0374			0,0271			0,0419			0,0758	

T2	1 (a)	1 (b)	1 (c)	2(a)	2 (b)	2 (c)	3 (a)	3 (b)	3 (c)	4 (a)	4 (b)	4 (c)	5 (a)	5 (b)	5 (c)
Planta, H	1,1925	0,9495	1,1567	1,0828	1,0784	1,0239	1,1982	1,1473	1,1088	0,9914	1,0505	1,0295	1,0998	1,1065	0,9955
Média do H das réplicas		1,0996			1,0617			1,1514			1,0238			1,0673	
Desvio padrão		0,1312			0,0328			0,0448			0,0300			0,0623	
Sedimento, H	1,1354	0,9741	1,0584	0,9490	1,0590	1,0424	1,1367	1,1248	1,1468	1,0503	1,0676	1,0600	0,9116	0,9999	0,9396
Média do H das réplicas		1,0560			1,0168			1,1361			1,0593			0,9504	
Desvio padrão		0,0807			0,0593			0,0110			0,0087			0,0451	

Equitabilidade (J):

TO	1 (a)	1 (b)	1 (c)	2(a)	2 (b)	2 (c)	3 (a)	3 (b)	3 (c)	4 (a)	4 (b)	4 (c)	5 (a)	5 (b)	5 (c)
Planta (H)	0,9082	0,9281	1,0156	0,8579	0,9882	1,0163	1,0177	1,1202	1,0257	0,9795	1,0015	1,0614	1,0232	1,0274	0,9849
Média H		0,9506			0,9541			1,0545			1,0141			1,0118	
H máx	0,9542	0,9542	1,0414	0,9542	1,0414	1,0414	1,0414	1,1461	1,0414	1,0000	1,0414	1,0792	1,0414	1,0414	1,0000
(J)	0,9517	0,9726	0,9752	0,8991	0,9489	0,9759	0,9772	0,9774	0,9849	0,9795	0,9617	0,9835	0,9826	0,9866	0,9849
Média, J		0,9665			0,9624			0,9798			0,9749			0,9847	
Desvio padrão		0,0129			0,0390			0,0044			0,0116			0,0020	
Sedimento (H)	1,1986	1,2109	1,2006	1,2156	1,1815	1,2008	1,2305	1,1851	1,1470	1,2060	1,2096	1,1897	1,2123	1,1838	1,1833
Média H		1,2034			1,1993			1,1875			1,2018			1,1931	
H máx	1,2304	1,2304	1,2304	1,2304	1,2304	1,2304	1,2553	1,2041	1,2041	1,2304	1,2304	1,2304	1,2304	1,2304	1,2304
(J)	0,9741	0,9841	0,9757	0,9880	0,9602	0,9759	0,9803	0,9842	0,9526	0,9801	0,9831	0,9669	0,9852	0,9621	0,9616
Média, J		0,9780			0,9747			0,9724			0,9767			0,9697	
Desvio padrão		0,0054			0,0139			0,0173			0,0086			0,0135	

T1	1 (a)	1 (b)	1 (c)	2(a)	2 (b)	2 (c)	3 (a)	3 (b)	3 (c)	4 (a)	4 (b)	4 (c)	5 (a)	5 (b)	5 (c)
Planta (H)	1,1212	1,0995	1,0634	1,2252	1,2177	1,2321	1,1901	1,2136	1,2025	1,0771	1,0220	1,0141	1,0784	0,9924	1,0938
Média H		1,0947			1,2250			1,2021			1,0377			1,0549	
H máx	1,1761	1,1461	1,1139	1,2788	1,2553	1,2788	1,2304	1,2788	1,2304	1,1139	1,0414	1,0414	1,1139	1,0414	1,1461
(J)	0,9533	0,9593	0,9547	0,9581	0,9701	0,9635	0,9672	0,9490	0,9773	0,9669	0,9814	0,9738	0,9681	0,9530	0,9544
Média J		0,9557			0,9639			0,9581			0,9740			0,9585	
Desvio padrão		0,0031			0,0060			0,0143			0,0073			0,0084	
Sedimento (H)	0,8299	0,9056	0,8466	0,7851	0,7922	0,8532	0,9149	0,9280	0,9670	0,9625	0,8920	0,8881	0,5557	0,6952	0,5741
Média H		0,8607			0,8101			0,9366			0,9142			0,6083	
H máx	0,9031	0,9542	0,9031	0,8451	0,8451	0,9031	0,9542	1,0000	1,0414	1,0414	0,9542	0,9542	0,6990	0,6990	0,7782
(J)	0,9190	0,9490	0,9374	0,9290	0,9374	0,9447	0,9588	0,9280	0,9286	0,9242	0,9348	0,9307	0,7951	0,9946	0,7377
Média J		0,9351			0,9370			0,9384			0,9299			0,8425	
Desvio padrão		0,0152			0,0078			0,0176			0,0053			0,1348	

T2	1 (a)	1 (b)	1 (c)	2(a)	2 (b)	2 (c)	3 (a)	3 (b)	3 (c)	4 (a)	4 (b)	4 (c)	5 (a)	5 (b)	5 (c)
Planta (H)	1,1925	0,9495	1,1567	1,0828	1,0784	1,0239	1,1982	1,1473	1,1088	0,9914	1,0505	1,0295	1,0998	1,1065	0,9955
Média H		1,0996			1,0617			1,1514			1,0238			1,0673	
H máx	1,2304	1,1761	1,2304	1,1461	1,1139	1,0792	1,2304	1,2041	1,1461	1,0414	1,0792	1,0792	1,1461	1,1461	1,0414
(J)	0,9692	0,8074	0,9401	0,9447	0,9681	0,9488	0,9738	0,9528	0,9674	0,9520	0,9735	0,9539	0,9596	0,9655	0,9559
Média J		0,9055			0,9539			0,9647			0,9598			0,9603	
Desvio Padrão		0,0863			0,0125			0,0108			0,0119			0,0048	
Sedimento (H)	1,1354	0,9741	1,0584	0,9490	1,0590	1,0424	1,1367	1,1248	1,1468	1,0503	1,0676	1,0600	0,9116	0,9999	0,9396
Média H		1,0560			1,0168			1,1361			1,0593			0,9504	
H máx	1,1761	1,0414	1,1139	1,0414	1,1139	1,0792	1,1761	1,1761	1,1761	1,1139	1,1461	1,1761	0,9542	1,0414	1,0000
(J)	0,9654	0,9354	0,9502	0,9112	0,9507	0,9660	0,9665	0,9564	0,9751	0,9428	0,9315	0,9013	0,9553	0,9601	0,9396
Média J		0,9503			0,9426			0,9660			0,9252			0,9517	
Desvio padrão		0,0150			0,0282			0,0093			0,0215			0,0108	