

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Diversidade taxonômica e funcional de comunidades microbianas em lagoas
salino-alcálinas do Pantanal brasileiro**

Gabriela Machieski da Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2015**

Gabriela Machineski da Silva
Engenheira Agrônoma

**Diversidade taxonômica e funcional de comunidades microbianas em lagoas salino-
alcalinas do Pantanal brasileiro**

Orientadora:
Profa. Dra. **MARLI DE FÁTIMA FIORE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Silva, Gabriela Machineski da

Diversidade taxonômica e funcional de comunidades microbianas em lagoas salino-
alcalinas do Pantanal brasileiro / Gabriela Machineski da Silva. - - Piracicaba, 2015.
103 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2015.

1. Arsênio 2. Lagos de soda 3. Mercúrio 4. Nitrogênio 5. Perfil metabólico
6. Pirosequenciamento 7. Salina 8. Sequenciamento metagenômico 9. Selênio
I. Título

CDD 576.15
S586d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Essa etapa de formação profissional não poderia ter sido concretizada sem a ajuda da minha amada família, que, durante todo o percurso da minha vida, proporcionou-me, além muito carinho e amor, princípios de integridade, perseverança e de procurar sempre em Deus força maior para o meu desenvolvimento como ser humano. Por essa razão, gostaria de dedicar este trabalho a vocês, junto a minha imensa gratidão e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por estar sempre me guiando durante essa caminhada.

À professora Marli F. Fiore, meu muito obrigado pela confiança, paciência e orientação nessa etapa de crescimento profissional e pessoal.

À amiga Ana Paula D. Andreote, não só pela amizade, carinho e auxílio técnico, mas, principalmente, pelo sorriso e bom humor constantes, que me deu força durante essa jornada, e por toda contribuição com importantes e enriquecedoras sugestões.

À ESALQ/USP, em particular o programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade e formação profissional. Ao CENA/USP pela estrutura.

À FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos professores Dr. Márcio R. Lambais e Dr. Fernando D. Andreote pela estrutura, materiais e equipamentos de seus laboratórios.

Ao Dr. Laurent Barbiéro pelo suporte financeiro e auxílio na coleta.

Aos amigos Diego B. Genuário e Marcelo G. M. V. Vaz pela coleta das amostras.

Aos colegas Ana Paula D. Andreote, Ademir Durrer, Danilo Alvarenga, Francisco Dini Andreote, Elisa Matos Janaina Rigonato, Julia Lima, Marcelo Vaz, Thiago Gumiere pela ajuda nas análises.

Aos meus queridos pais, Oswaldo e Rute, pelo incentivo e amor dedicados a mim; meu esposo e companheiro Fábio, pelo inestimável apoio, amor e tolerância durante esses anos; minha irmã Izabella pelo amor e amizade; a minha avó Algimira por tanto carinho. Vocês são essenciais.

Aos amigos do Laboratório Biologia Celular e Molecular, Andresa, Bruno baiano, Bruno piracicabano, Carol H., Danilo, Diego, Elaine, Janaina, Karina, Marcelo, Talita e Stella pela alegre convivência, companheirismo e conhecimento compartilhado.

Aos amigos pós-graduandos do programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do CENA, em especial aos grandes amigos Alessandra, Bruno baiano, Kadine e Stella, por fazerem parte, sem dúvida alguma, dos melhores momentos desta jornada.

É com muita satisfação que expresso aqui o meu mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram a realização deste trabalho possível.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivos Específicos	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
3.1 Avaliação da diversidade microbiana.....	21
3.2 Diversidade microbiana em ambientes extremos	23
3.2.1 Diversidade microbiana em ambientes salinos e alcalinos.....	24
3.3 O Pantanal brasileiro e a região da Nhecolândia.....	27
3.4 As salinas do Pantanal da Nhecolândia	28
3.5 Biogeoquímica das salinas do Pantanal da Nhecolândia.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Área de estudo e amostragem.....	33
4.2 Características físico-químicas das salinas.....	36
4.3 Extração do DNA total	37
4.4 Quantificação dos genes 16S RNAr e <i>nifH</i>	38
4.4 Pirosequenciamento do gene 16S RNAr.....	39
4.5 Análise metagenômica das salinas	40
4.5.1 Construção e sequenciamento da biblioteca metagenômica.....	40
4.5.2 Processamento e análise das sequências metagenômicas.....	41
4.5.3 Detecção de genes específicos.....	42
4.5 Análises estatísticas	43
5 RESULTADOS	45
5.1 Avaliação das características físico-químicas das salinas	45
5.2 Abundância da comunidade bacteriana e cianobacteriana nas salinas	48
5.3 Pirosequenciamento do gene 16S RNAr.....	49
5.4 Composição taxonômica da comunidade bacteriana das salinas.....	50
5.5 Relação entre a comunidade bacteriana e as variáveis ambientais observadas.....	52
5.6 Diversidade da comunidade bacteriana nas salinas Verde e Preta	53
5.7 Perfis taxonômicos e funcionais obtidos pelo sequenciamento metagenômico (<i>shotgun</i>).58	

5.8 Busca por genes microbianos envolvidos na ciclagem de arsênio, mercúrio e selênio	64
5.9 Dinâmica do Nitrogênio nas salinas do Pantanal.....	65
5.9.1 Abundância da comunidade diazotrófica nas salinas Verde e Preta.....	65
5.9.2 Busca de genes microbianos envolvidos no ciclo biogeoquímico do nitrogênio	66
6 DISCUSSÃO	73
6.1 Diversidade microbiana nas salinas do Pantanal com e sem floração	73
6.2 Metabolismo microbiano nas salinas	75
6.2.1 Metabolismo de arsênio, mercúrio e selênio nas salinas	76
6.2.2 Metabolismo de nitrogênio nas salinas	78
7 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICES.....	95

RESUMO

Diversidade taxonômica e funcional de comunidades microbianas em lagoas salino- alcalinas do Pantanal brasileiro

As lagoas salino-alcalinas (salinas) da sub-região Nhecolândia do Pantanal, Mato Grosso do Sul, combinam valores de pH elevados com a presença de altas concentrações de sal, assemelhando-se aos lagos de soda da África Oriental. O entendimento atual dos mecanismos físicos, químicos e biológicos nestes ambientes extremos do Brasil é limitado. Embora os micro-organismos estejam envolvidos nos processos biogeoquímicos em ecossistemas aquáticos, investigações sobre os grupos bacterianos que contribuem para a diversidade e funções específicas nessas salinas inexistem. Assim, a presente dissertação centrou-se na avaliação da comunidade bacteriana de duas salinas (Salina Verde e Salina Preta), localizadas na sub-região da Nhecolândia. Especificamente, investigou-se a diversidade e a estrutura das comunidades bacterianas, os perfis metabólicos das lagoas e genes funcionais que codificam enzimas relacionadas a transformação do nitrogênio, mercúrio, selênio e arsênio. As amostras de água foram coletadas durante a estação seca (setembro de 2012) na Salina Verde (pH 9,5, E.C. 2575 mS·cm⁻¹), caracterizada pela presença constante de floração de cianobactérias e na Salina Preta (pH 8,9, E.C. 1500 mS·cm⁻¹), sem registro de ocorrência de floração. As amostragens foram realizadas em triplicatas em duas profundidades (superfície e fundo) e duas vezes no dia (10:00 h e 15:00 h) devido à ocorrência natural de saturação de oxigênio observada na Salina Verde. O DNA total de cada amostra ambiental foi extraído e a diversidade bacteriana e funcionalidade foram acessadas por pirosequenciamento do gene de 16S RNAr e sequenciamento metagenômico. A análise de PCR quantitativa do gene de 16S RNAr foi realizada de forma a quantificar a comunidade bacteriana. A abundância bacteriana foi maior na Salina Verde do que na Salina Preta (10¹⁰ e 10⁹ cópias·mL⁻¹, respectivamente). As sequências parciais do gene de 16S RNAr obtidas no pirosequenciamento mostraram a dominância de táxons do gênero *Anabaenopsis* sp. na floração da Salina Verde, englobando até 92% do total de sequências. A comunidade bacteriana da Salina Preta apresentou os maiores índices de diversidade e riqueza, sendo dominantes os filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria e Verrucomicrobia. Apenas a Salina Preta mostrou diferenças na comunidade bacteriana de acordo com as profundidades amostradas. Na superfície desta lagoa, os filos Actinobacteria e Verrucomicrobia predominaram, enquanto no fundo, prevaleceram os filos Proteobacteria e Chlamydiae. A temperatura foi detectada como o fator abiótico que influenciou a heterogeneidade espacial da Salina Preta. Por sua vez, a alcalinidade e o pH foram os fatores que impulsionaram as diferenças e variações das comunidades bacterianas em ambas as lagoas. Genes bacterianos envolvidos nos ciclos biogeoquímicos do nitrogênio, mercúrio e arsênio foram encontrados nas salinas Verde e Preta, sugerindo uma elevada redundância funcional nas transformações desses elementos. Não foram encontrados genes microbianos envolvidos no ciclo do selênio. Os dados gerados revelaram uma comunidade microbiana taxonômica e funcionalmente complexa que habita as salinas. Os resultados deste estudo fornecem uma avaliação aprofundada baseada em abordagens independentes de cultivo, sendo este um passo importante na compreensão da dinâmica funcional desses ambientes no Pantanal brasileiro.

Palavras-chave: Arsênio; Lagos de soda; Mercúrio; Nitrogênio; Perfil metabólico; Pirosequenciamento; Salina; Sequenciamento metagenômico; Selênio

ABSTRACT

Taxonomical and functional diversity of microbial communities in saline-alkaline lakes from Brazilian Pantanal

The saline-alkaline lakes (salinas) of the Nhecolândia sub-region of the Pantanal, Mato Grosso do Sul state, combine high pH values with the presence of high salt concentrations, resembling the soda lakes of East Africa. The current understanding of physical, chemical and biological mechanisms in these extreme environments is limited. Although microorganisms are involved in biogeochemical processes in aquatic ecosystem, researches on the bacterial groups that contribute to diversity and specific functions in these salinas are scarce. This dissertation therefore focused on the evaluation of bacterial community of two salinas (Salina Verde and Salina Preta) located in the Nhecolândia sub-region. Specifically, it was investigated the diversity and structure of bacterial communities, the metabolic profile of the lakes and functional genes that encode the nitrogen, mercury and arsenic-transforming enzymes. Water samples were collected during the dry season (September 2012) from Salina Verde (pH 9.5, E.C. 2575 mS·cm⁻¹), characterized by constant presence of cyanobacterial bloom, and from Salina Preta (pH 8.9, E.C. 1500 mS·cm⁻¹), with no report of bloom occurrence. Triplicate samplings were carried out in two depths (surface and bottom) and twice a day (10 AM and 3 PM) due to naturally occurrence of oxygen saturation, observed at Salina Verde. Total DNA of each environmental sample was extracted and bacterial diversity and functionality were accessed by 16S rRNA gene pyrosequencing and metagenomic sequencing. Analysis of quantitative PCR of the 16S rRNA gene was performed in order to quantify the bacterial community. Bacterial abundance was higher in the Salina Verde than in the Salina Preta (10¹⁰ and 10⁹ copies·mL⁻¹, respectively). The partial sequences of the 16S rRNA gene obtained in the pyrosequencing revealed the genus *Anabaenopsis* sp. as the dominant taxa in the Salina Verde bloom, encompassing up to 92% of the total bacteria. Bacterial community of the Salina Preta showed the highest diversity and richness index, with dominant phyla Proteobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria and Verrucomicrobia. Only the Salina Preta showed differences in bacterial community in accordance with the depths sampled. On the surface of this lake, the phyla Actinobacteria and Verrucomicrobia predominated, while in the bottom, Proteobacteria and Chlamydiae prevailed. The temperature was detected as the abiotic factor influencing the spatial heterogeneity at Salina Preta. On the other hand, alkalinity and pH were the factors driving the differences and variation of bacterial community in both lakes. Bacterial genes involved in the biogeochemical cycles of nitrogen, mercury and arsenic were found in Salina Verde and Salina Preta, suggesting a high metabolic redundancy in the transformation these elements. No microbial genes involved in selenium cycle were found. The data showed a taxonomic and functional complex microbial community inhabiting salinas. The results of this study provide a detailed assessment based on culture-independent approaches, which is a stepping stone to understand the functional dynamics of these environments in the Brazilian Pantanal.

Keywords: Arsenic; Soda lakes; Mercury; Nitrogen; Metabolic profile; Pyrosequencing; Saline; Metagenomic sequencing; Selenium

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização das salinas estudadas. Salina Verde (A) e Salina Preta (C).....	34
Figura 2 - Imagem aérea da salina verde, Pantanal da Nhecolândia, MS. Fonte: Google Earth, 2014 (A); Solo arenoso da praia (B); Coloração esverdeada da água devido à floração (C e D); Praia com ausência de vegetação (E).	35
Figura 3 - Imagem aérea da salina preta, Pantanal da Nhecolândia, MS. Fonte: Google Earth, 2014 (A); Coloração escura da água (B); Praia com presença de arbustos e gramíneas (C).....	36
Figura 4 - Características físico-químicas avaliadas <i>in situ</i> durante a coleta nas salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro.	47
Figura 5 - Abundância de Bacteria total e Cyanobacteria estimadas por qPCR nas salinas Verde e Preta no Pantanal, MS, Brasil. As barras de erro indicam o desvio padrão de abundâncias relativas entre as três repetições.	49
Figura 6 - Abundância dos diferentes filos bacterianos encontrados nas salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro. Classificação realizada utilizando o programa QIIME, com o sistema de classificação RDP. (Média de três repetições).	51
Figura 7 - Análise multivariada de redundância (RDA) associada ao teste de Monte Carlo ($p < 0,05$) da composição da comunidade bacteriana e variáveis ambientais das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro.	52
Figura 8 - Curva de rarefação construída com o número de espécies observadas (UTOs) das salinas do Pantanal brasileiro, baseada no resultado do pirosequenciamento do gene 16S RNAr.....	54
Figura 9 - Análise de Coordenada Principal (PCoA) de pela métrica UniFrac versão <i>unweighted</i> da comunidade bacteriana das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro.	55
Figura 10 - Análise de Coordenada Principal (PCoA) de pela métrica UniFrac versão <i>weighted</i> da comunidade bacteriana das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro.	55
Figura 11 - Análise de agrupamento (<i>heatmap</i>) ao nível de filo baseado perfil das comunidades bacterianas das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro a partir da comparação múltipla por Tukey-Krammer ($p < 0,05$).....	56

Figura 12 - Comparação das médias de abundância dos principais filos das comunidades bacterianas das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro pelo teste Welch ($p < 0,05$).	57
Figura 13 - Comparação das médias de abundância dos principais filos da superfície e fundo da comunidade bacteriana da salina Preta pelo teste Welch ($p > 0,05$).....	58
Figura 14 - Frequência relativa da afiliação taxonômica das sequências obtidas das bibliotecas metagenômicas das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro.	58
Figura 15 - Frequência relativa das sequências de bactérias afiliadas ao nível de filo das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro.	59
Figura 16 - Perfis funcionais obtidos pelo sequenciamento metagenômico das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro.	60
Figura 17 - Análise de agrupamento (<i>heatmap</i>) baseado no perfil funcional das comunidades microbianas das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro a partir da comparação múltipla por Tukey-Kramer ($p < 0,05$).	61
Figura 18 - Comparação das frequências relativas dos grupos funcionais encontrados na comunidade microbiana das salinas Verde e Preta pelo teste Welch ($p > 0,05$)..	62
Figura 19 - Mapa das vias metabólicas (KEGG) baseado no sequenciamento metagenômico das salinas Verde (vias em vermelho) e Preta (vias em azul) do Pantanal brasileiro.....	63
Figura 20 - Detecção dos genes microbianos <i>aoxA</i> e <i>aoxB</i> relacionados ao ciclo biogeoquímico de Arsênio nas salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro..	64
Figura 21 - Detecção do gene microbiano <i>merA</i> relacionado ao ciclo biogeoquímico do Mercúrio nas salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro.	65
Figura 22 - Abundância da comunidade bacteriana total e cianobacteriana diazotrófica das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro. As barras de erro indicam o desvio padrão de abundâncias relativas entre as três repetições.....	66
Figura 23 - Detecção dos genes relacionados ao ciclo biogeoquímico do nitrogênio encontrados nas bibliotecas metagenômicas das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro.....	67
Figura 24 - Esquema das transformações do nitrogênio e respectivos genes microbianos envolvidos buscados na biblioteca metagenômica.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis químicas das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro.	46
Tabela 2 - Número de sequências obtidas pelo pirosequenciamento e estimativa de cobertura para cada uma das 8 amostras analisadas (média de três repetições).....	50
Tabela 3 - Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) das comunidades bacterianas das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro, baseados no resultado de pirosequenciamento. (Média de três repetições – médias comparadas pelo teste Tukey $p < 0,05$).	54
Tabela 4 - Identificação taxonômica das sequências dos genes relacionados aos processos de transformação do nitrogênio nas Salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro.	67

1 INTRODUÇÃO

Ambientes extremos podem ser definidos como aqueles que possuem características que permitem a vida e sobrevivência apenas um grupo restrito de espécies. Contudo, para cada condição ambiental extrema, uma variedade de micro-organismos pode tolerar tais condições ou exigí-las para sua sobrevivência (RAMPELOTTO, 2010). Lagoas salino-alcálicas (com altos valores de pH e elevadas concentrações de sal) são distribuídas pelo planeta, ocorrendo principalmente na África, Estados Unidos, América do Sul, Índia e China (OREN, 2002; CASAMAYOR et al., 2013).

O Pantanal brasileiro é uma das planícies de inundação mais extensas do mundo, possuindo uma alta biodiversidade e um complexo sistema hidrológico. Numa região particular desse bioma, conhecida como Nhecolândia, encontram-se rios, lagoas de água doce e lagoas salino-alcálicas (“salinas”) coexistindo. As salinas do Pantanal são ambientes fisicamente isoladas de áreas de inundação, que apresentam elevado pH (> 10) e são ricas em NaHCO_3 , semelhantes aos lagos de soda encontrados na África (DUCKWORTH et al., 1996; JONES et al., 1998), sendo os únicos ambientes com essas características no território brasileiro. As salinas não são habitadas por peixes ou outros vertebrados, nem por plantas aquáticas, de modo que a biodiversidade que abrigam se restringe a micro-organismos. Estudos disponíveis referentes à biodiversidade nesses ambientes baseiam-se em levantamentos florísticos e abordagens dependentes de cultivo, e se restringem aos grupos das cianobactérias e microalgas (MALONE et al., 2007; ANDREOTE et al., 2014; VAZ et al., 2015), principalmente devido à ocorrência de florações.

O fenômeno de floração é comumente descrito em lagos salino-alcálicos, podendo ser sazonais ou permanentes (GRANT et al., 1990). Esse fenômeno consiste na multiplicação significativa da biomassa devido a um desequilíbrio entre o crescimento do fitoplâncton e os processos de perda (CARSTENSEN et al., 2007). Diversos táxons podem ser dominantes em florações em diferentes lagos de soda distribuídos pelos continentes africano, americano e asiático, tais como: *Spirulina*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, entre outros (PIKUTA; HOOVER, 2007). Nas salinas do Pantanal, algumas lagoas possuem floração constantemente, como as salinas Verde e Grande, outras sazonalmente, como as salinas 67 mil e Centenário e outras não apresentam tal fenômeno, como a salina Preta (ANDREOTE et al., 2014).

As águas das salinas pertencem à mesma família química (BARBIÉRO et al., 2008) e estudos realizados nas últimas décadas têm descrito a origem e a composição hidrogeoquímica dessas lagoas (BARBIÉRO et al., 2007; MARIOT et al., 2007; REZENDE

FILHO, 2012). Contudo, não há nenhuma informação disponível sobre quais os processos metabólicos determinantes dos perfis encontrados. Em particular para os elementos nitrogênio, arsênio, mercúrio e selênio sabe-se que a concentração do primeiro é elevada, que há um acúmulo do segundo e uma perda acentuada dos dois últimos nas salinas do Pantanal (BARBIÉRO et al., 2007).

O conhecimento sobre a diversidade microbiana vem sendo ampliado exponencialmente devido aos avanços gerados pelas técnicas de biologia molecular independentes do cultivo. O uso de tais abordagens pode auxiliar no entendimento da composição da comunidade microbiana que habita as salinas do Pantanal brasileiro, assim como gerar informações importantes sobre as o potencial metabólico dessa comunidade, nos permitindo agregar dados de funcionalidade às informações taxonômicas.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade taxonômica e funcional das comunidades microbianas em duas lagoas salino-alcálicas do Pantanal da Nhecolândia-MS, Brasil, com diferentes perfis físico-químicos e limnológicos.

2.1 Objetivos Específicos

Para atingir o objetivo geral do trabalho, foram considerados os seguintes objetivos específicos:

Acessar, por meio do sequenciamento parcial do gene 16S RNAr, a comunidade bacteriana presente em duas lagoas salino-alcálicas e determinar como a composição dessa comunidade varia considerando-se duas profundidades (superfície e fundo) e dois tempos ao longo do dia.

Quantificar a comunidade bacteriana por meio do qPCR do gene 16S RNAr e a comunidade bacteriana diazotrófica por meio do qPCR do gene *nifH*.

Avaliar a diversidade funcional microbiana nas lagoas salino-alcálicas por meio de sequenciamento metagenômico e inferências sobre o potencial metabólico.

Identificar genes microbianos envolvidos nos ciclos biogeoquímicos do arsênio, mercúrio, selênio e nitrogênio nessas lagoas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Avaliação da diversidade microbiana

Os micro-organismos foram os primeiros organismos vivos no planeta, e após cerca de três bilhões de anos de evolução desenvolveram habilidades para habitar os mais distintos ambientes na Terra (ATLAS; BARTHA, 1997). Existem representantes de micro-organismos nos três domínios da vida, *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*, sendo os organismos pertencentes ao domínio *Bacteria* os maiores constituintes da biota terrestre e, ainda assim, os menos conhecidos em termos de diversidade.

A diversidade microbiana pode ser definida como a gama de diferentes tipos de organismos e sua abundância relativa em uma comunidade, podendo ser acessada utilizando-se vários critérios, como a filogenia, fisiologia, metabolismo e genômica (KELLER; ZENGLER, 2004). Os métodos tradicionais para estudos de caracterização de comunidades microbianas são baseados em análises da porção de organismos cultiváveis. Contudo, estima-se que mais de 99% dos micro-organismos observáveis na natureza não são cultivados utilizando técnicas convencionais de isolamento e cultivo (HUGENHOLTZ et al., 1998). Devido a maior porção de micro-organismos não ser cultivada, há dificuldade em relacionar esses métodos na interpretação da estrutura geral dessas comunidades (FAKRUDDIN; MANNAN, 2013). Desse modo, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos que contemplem também esses organismos, já que se estima que existam milhões de grupos ainda desconhecidos (HUGENHOLTZ et al., 1998).

Nos últimos anos, o interesse renovado nos estudos de taxonomia microbiana foi muito relacionado ao desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, as quais aumentaram a disponibilidade de métodos para a identificação e classificação mais rápida e precisa de micro-organismos, baseado em sequências de DNA. A utilização de técnicas de biologia molecular tem revelado a grande diversidade microbiana em muitos ecossistemas e tem auxiliado na organização da sistemática destes seres vivos (STRALIOTTO, RUMJANEK, 1999). Ainda, análises da diversidade microbiana ao longo das últimas décadas tem resultado em um enorme aumento de novos filotipos no domínio *Bacteria* (KELLER; ZENGLER, 2004).

Diferentes abordagens baseadas em diversidade genética tem sido desenvolvidas para o estudo de comunidades microbianas, como re-associação de DNA, hibridização DNA-DNA e mRNA-DNA, clonagem e sequenciamento de DNA e outras técnicas baseadas em PCR.

Com o surgimento das tecnologias de sequenciamento de segunda geração, como o pirosequenciamento, tornou-se possível a descoberta massiva de novos grupos microbianos em amostras ambientais sem o cultivo de linhagens e esclarecido aspectos relacionados à complexidade das populações microbianas (FAKRUDDIN; MANNAN, 2013). A técnica tem fornecido meios para elucidar membros da biosfera rara que ocorrem em menor abundância, além de produzir uma enorme quantidade de sequências (FAKRUDDIN; CHOWDHURY, 2012).

O gene codificador da subunidade 16S do RNA ribossomal (16S RNAr) é o mais utilizado em estudos de diversidade, sendo universalmente distribuído nos organismos procariotos. Esse gene codifica um RNA funcional, sendo pouco afetado por mutações ou transferência horizontal de genes (DAUBIN et al., 2003). Ainda, possui uma sequência de regiões variáveis, flanqueadas por regiões altamente conservadas, convenientes para o desenho de iniciadores, as quais permitem a amplificação de regiões específicas e comparação por similaridade entre as sequências geradas, base para avaliações filogenéticas. Além disso, há um vasto banco de dados de sequências disponível para este gene (AMANN et al., 1995), como o *Ribosomal Database Project* que possui mais de 3 milhões destas sequências (COLE et al., 2008), o *Silva comprehensive ribosomal RNA database* com mais de 4 milhões de sequências (QUAST et al., 2012), o *Genbank* (BENSON et al., 2013), entre outros. Sendo assim, métodos independentes de cultivo com base no gene 16S RNAr tornaram-se comuns para descrever a comunidade de bactérias de amostras ambientais, (BOKULICH et al., 2012; BLAZEWICZ et al., 2013).

A diversidade também pode ser acessada via abordagens metagenômicas, que utilizam o sequenciamento em larga escala do DNA extraído diretamente de amostras ambientais. Combinado com ferramentas de bioinformática, a abordagem permite resumir o mapa genético dos organismos em uma determinada comunidade (RIESENFELD et al., 2004). Essa ferramenta propicia além do acesso à diversidade microbiana de um ambiente, informações relacionadas à composição e potencial funcional, possibilitando identificar numericamente os organismos dominantes neste ambiente, obter informações sobre a sua distribuição no tempo e no espaço e avaliar a contribuição microbiana nos ciclos biogeoquímicos dos elementos, assim como sobre seu metabolismo.

3.2 Diversidade microbiana em ambientes extremos

Os micro-organismos são a forma de vida mais diversa e abundante na Terra, estando presente em todos os ambientes e possuindo papel crucial para a biosfera, uma vez que catalisam todos os processos biogeoquímicos responsáveis pela manutenção da vida (TORSVIK et al., 2002). Essa distribuição compreende, inclusive, ambientes extremos, que podem ser definidos como aqueles que apresentam um conjunto de características nas quais apenas um grupo taxonômico restrito seja capaz de sobreviver (OREN, 2001). Condições extremas tais como temperatura, pressão, atividade de água, salinidade e pH podem alterar as interações fundamentais que mantêm as biomoléculas funcionais, afetando a integridade celular. Contudo, uma variedade de micro-organismos pode não só tolerar estas condições, como até exigir essas características para sua sobrevivência (RAMPELOTTO, 2010). Já se tem registros de micro-organismos desenvolvendo-se a 7 km de profundidade no interior da crosta terrestre, a mais de 10 km de profundidade no oceano, sob pressões atmosféricas de até 110 Mpa, em condições ácidas (pH 0) e básicas extremas (pH 12,8) e em temperaturas de -20 °C até 122 °C (RAMPELOTTO, 2010).

A diversidade taxonômica dos organismos que habitam ambientes extremos abrange os três domínios da vida. Embora todos os hipertermófilos (organismos que habitam ambientes com altas temperaturas) pertençam aos domínios *Archaea* e *Bacteria*, eucariotos são comuns entre os organismos que vivem a baixas temperaturas (psicrófilos), condições ácidas (acidófilos), e alcalinas (alcalófilos), elevada pressão atmosférica (piezófilos), pouca disponibilidade de água (xerófilos) e alta salinidade (halófilos) (ROTHSCHILD; MANCINELLI, 2001). De modo geral, há uma prevalência de micro-organismos procariotos em ambientes extremos, devido ao seu tamanho reduzido e diversidade metabólica e funcional, que permite a coexistência dos metabolismos aeróbico, micro-aerofílico e anaeróbico em gradientes biogeoquímicos (PAERL et al., 2000).

Atualmente, não se conhece por completo a diversidade microbiana extremófila e os mecanismos de adaptação e funcionalidades de muitos grupos microbianos que existem nestes ambientes, assim como quais as condições e variações ambientais que modelam a estrutura dessas comunidades (CASAMAYOR et al., 2013). Esses ambientes considerados extremos se diferem pela ampla variedade de fatores físico-químicos e biológicos que compõem o ambiente. Tradicionalmente, as características extremas relacionadas a pH e a salinidade são consideradas extremos geoquímicos, enquanto as demais, como temperatura, pressão, e

radiação são referidas como extremos físicos, sendo que as espécies que habitam esses ambientes interagem entre si e com o ambiente (PIKUTA; HOOVER, 2007).

Estudos sobre micro-organismos extremófilos têm fornecido informações relevantes e aplicações biotecnológicas interessantes. Na área de biologia molecular, informações sobre o dobramento de proteínas (ROTHSCHILD; MANCINELLI, 2001) e a obtenção da enzima Taq polimerase são os exemplos mais conhecidos (BROCK; FREEZE, 1969). Enzimas obtidas de organismos extremófilos, tais como amilases, proteases, celulases e xilanases, possuem elevada estabilidade, o que favorece seu uso em processos industriais (TANGO; ISLAM, 2002). Micro-organismos isolados de habitats com altas temperaturas e pressões, ricos em urânio e carbono orgânico, tem sido utilizados para remoção de urânio de ambientes aquáticos (NEVIN et al., 2003). Ainda, já se tem registro de vários biopolímeros sendo produzidos por micro-organismos halófilos, como biossurfactantes, polissacarídeos e bioplásticos (TANGO; ISLAM, 2002). Apesar desses conhecimentos, muitas características fisiológicas e metabólicas destes organismos ainda precisam de um estudo mais aprofundado para serem totalmente compreendidas.

3.2.1 Diversidade microbiana em ambientes salinos e alcalinos

Os ambientes salinos estão globalmente distribuídos e são considerados extremos à vida microbiana (OREN, 1999). Organismos halófilos, aqueles capazes de se desenvolver em ambientes com salinidade superior a 3% de concentração do sal predominante (VENTOSA; ARAHAL, 2003), possuem representantes incluindo arqueias heterotróficas e metanogênicas, bactérias fotossintetizantes, litotróficas e heterotróficas, e eucariotos fotossintetizantes e heterotróficos (DONG; YU, 2007; OREN, 2002). Estudos demonstraram que a diversidade taxonômica bacteriana em ambientes salinos e hipersalinos é baixa (DASSARMA; ARORA, 2001; OREN, 2001), consolidando os princípios ecológicos gerais que consideram que os ambientes mais extremos são habitados por comunidades menos diversas (FRONTIER, 1985). Ainda, a abundância de grupos especializados, tais como as arqueias pode aumentar sob determinadas condições extremas de salinidade (JIANG et al., 2007; MATURRANO et al., 2006).

Estudos baseados na caracterização do gene 16S rRNA amplificados diretamente do DNA de amostras ambientais provenientes de ambientes hipersalinos tem sido usados para aumentar as informações disponíveis sobre a diversidade microbiana nesses ambientes, como nas salinas de Alicante, Espanha (BENLLOCH et al., 1995), Mono Lake na Califórnia, Estados Unidos (HUMAYOUN et al., 2003) e Great Salt Lake em Utah, Estados Unidos

(BAXTER et al., 2005). Essas pesquisas têm fornecido informações relevantes para a determinação das condições de cultivo ideais para organismos até então não cultiváveis, utilizando sequências para inferir sobre requisitos nutricionais e regulação genética do metabolismo (OREN, 2009).

A composição da comunidade microbiana é altamente afetada pela salinidade dos ambientes (DONG; YU, 2007). Particularmente na composição da comunidade bacteriana, Wu e colaboradores (2006) estudando ambientes aquáticos na China, ao longo de um gradiente de salinidade, observaram que com o aumento da salinidade, houve uma maior abundância dos grupos Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria e menor de Betaproteobacteria. As observações realizadas são coerentes com os estudos de Henriques e colaboradores (2006), que examinando a sucessão de vários grupos bacterianos dos ambientes salinos e de água doce de um estuário em Portugal, também observaram nos ambientes salinos a dominância dos grupos Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria, enquanto que nos ambientes de água doce predominaram os grupos Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Epsilonproteobacteria.

Condições de salinidade estão relacionadas ao equilíbrio osmótico celular. Um organismo não adaptado a condições de alta salinidade, quando exposto, deve lidar com um potencial químico maior em sua água citoplasmática do que na água do ambiente. Devido à água sempre fluir do maior potencial químico para o menor até obter um equilíbrio, a condição de alta salinidade acarretará na perda de um amplo volume de água e a célula encolherá. Por conseguinte, o crescimento celular será cessado, bem como as taxas metabólicas e a produção de proteínas (KUNTE, 2012). Além, de afetar o equilíbrio osmótico, a alta salinidade pode ainda reduzir a capacidade de fixação de nitrogênio por bactérias, diminuir a germinação de esporos e o crescimento de hifas, e alterar a morfologia de fungos e afetar negativamente o funcionamento de algumas enzimas microbianas (BORDELEAU; PREVOST, 1994; SILVA; FAY, 2012). Para evitar qualquer dano, as células microbianas de organismos adaptados a esse tipo de ambiente lançam mão de algumas estratégias. Um primeiro mecanismo é conhecido como "estratégia de sal-em-citoplasma", e consiste na acumulação intracelular de um elevado teor de K^+ . Estrategicamente, as células mantêm no seu interior concentrações de sal que sejam ao menos equivalentes às concentrações externas, adaptando todos os sistemas intracelulares para a presença de concentrações elevadas de sal. Esse mecanismo requer grande adaptação do maquinário enzimático intracelular, e é, por conseguinte, energeticamente caro, sendo utilizada apenas pelas arqueias da ordem Halobacteriales e pelas bactérias da ordem Haloanaerobiales (PIKUTA; ROOVER, 2007).

Um segundo mecanismo de adaptação é a "estratégia osmólitos orgânicos", que envolve a acumulação de solutos orgânicos compatíveis dentro do citoplasma. Nesta estratégia, as células mantêm baixas concentrações de sal dentro de seu citoplasma, e a pressão osmótica do meio é equilibrado por esses solutos orgânicos compatíveis, sem a necessidade de adaptação especial dos sistemas intracelulares. Esse mecanismo é utilizado principalmente pelos domínios *Bacteria* e *Eukaria*, e algumas arqueias metanogênicas (KERKAR, 2004).

Condições alcalinas, por sua vez, são extremas, pois, nesses ambientes as concentrações de íons de hidrogênio são muito baixas e o metabolismo celular é afetado. As células têm problemas com o funcionamento da enzima ATP sintase para produzir energia e com a utilização de alguns íons essenciais, como magnésio e cálcio, que precipitam na forma de sais ficando disponíveis apenas em níveis muito baixos (KRULWICH et al., 1998). Os micro-organismos alcalófilos também desenvolveram mecanismos para contornar os possíveis danos celulares causados pela alcalinidade, como: a troca iônica, em que a própria célula ativamente bombeia íons essenciais para dentro ao passo que exporta outros para fora e assim mantém seu interior em quase neutralidade; a parede celular de organismos alcalófilos é negativamente carregada com polímeros que atuam como uma barreira de defesa às condições ambientais extremas (RAMPELOTTO, 2010); as enzimas de alguns organismos alcalófilos têm atividade ótima em pH muito maior do que o pH fisiológico ótimo de crescimento dos organismos, capacidade essa aproveitada para fins biotecnológicos (PIKUTA; HOOVER, 2007).

Alcalófilos são microrganismos que crescem de forma otimizada em valores de pH acima de 9,0, muitas vezes com pH ótimo em torno de 10,0, enquanto mostram pouco ou nenhum crescimento em valores de pH quase neutro. Os organismos que toleram essas condições, por sua vez, são conhecidos como álcali-tolerantes. Já se tem registro de organismos dos três domínios da vida, *Archaea*, *Bacteria* e *Eukaria*, capazes de tolerar altos pH (ROTHSCHILD; MANCINELLI, 2001). Esses organismos são frequentemente isolados de ambientes naturais que também tendem a ter altas concentrações de sais e, portanto, estes são chamados haloalcalófilos (GAREEB; SETATI, 2009). Ambientes alcalinos podem ser formados a partir de diversos processos, porém, todos compartilham da necessidade da existência de um processo contínuo, microbiano ou químico, para manutenção do pH elevado. Processos geoquímicos naturais como o intemperismo de minerais de silicatos na água podem gerar alcalinidade com valores de pH até 11, como ocorre nos lagos de soda, que representam os ambientes com pH altos mais estáveis da Terra (JONES et al., 1998). Esses ambientes contêm uma grande e inexplorada diversidade de micro-organismos e se apresentam como

uma excelente fonte de novos microrganismos. Ainda, existem vários processos metabólicos desconhecidos e enzimas de potencial interesse biotecnológico (OREN, 2009).

3.3 O Pantanal brasileiro e a região da Nhecolândia

O Pantanal é uma planície sedimentar contínua, formado há milhares de anos com o soerguimento da Cordilheira dos Andes. O Pantanal brasileiro compreende toda a área contínua inserida na Bacia do Alto Paraguai, sujeita a inundações periódicas. A área do Pantanal compreende 138.183 km², dos quais 48.865 km² (35,36%) estão no estado do Mato Grosso e 89.318 km² (64,64%) no estado do Mato Grosso do Sul. Esta planície ainda engloba o norte do Paraguai e leste da Bolívia, tornando o Pantanal a maior planície inundável da Terra (SILVA; ABDON, 1998). Este ecossistema apresenta uma sucessão espacial de lagoas, campos e formações arbóreas, combinadas em mosaico, cuja variação na composição, estrutura e distribuição espacial da vegetação define várias fitofisionomias ou unidades de vegetação (POTT, 1994). O clima do Pantanal é tropical com duas estações alternadas, uma seca, de abril a setembro, e outra úmida, de outubro a março (GARCIA, 1984). Esse ecossistema apresenta uma heterogeneidade edáfica e hidrológica, que impossibilita uma caracterização generalizada.

O bioma do Pantanal pode ser delimitado tanto por uma divisão geopolítica quanto por uma divisão fisiomorfológica (considerando os aspectos ecológicos) (SILVA; ABDON, 1998). Em função das diferenças na altura, época, grau e duração das inundações, dez sub-regiões foram definidas: Cáceres, Poconé, Barão de Melgaço, Paiaguás, Nhecolândia, Aquidauana, Miranda, Abobral, Paraguai e Nabileque (ADÁMOLI, 1987). No entanto, quando os critérios adotados são aspectos relacionados à inundação, relevo, solo e vegetação, o Pantanal é caracterizado em 11 sub-regiões, incluindo a região de Porto Murtinho às anteriormente citadas (SILVA; ABDON, 1998). Em termos gerais, se observam diferenças climáticas de uma sub-região para outra, do ponto de vista da intensidade e da distribuição dos fenômenos (GARCIA, 1984).

A sub-região da Nhecolândia tem uma área de aproximadamente 26.921 km² correspondente a 19,48% da área total do Pantanal e agrega áreas dos municípios de Rio Verde de Mato Grosso, Aquidauana e Corumbá, correspondente à fração do cone aluvial situada à margem esquerda do rio Taquari (SILVA; ABDON, 1998). Esse ecossistema possui habitualmente estações contrastantes ao longo do ano, com a média de precipitação pluviométrica anual oscilando entre 1000 e 1400 mm, com cerca de 80% das chuvas

concentradas no verão, principalmente em dezembro e janeiro. As temperaturas médias mensais do ar oscilam entre 19,9 °C (julho) e 27,4 °C (dezembro) e a umidade relativa do ar, em torno de 76% (BAZZO et al., 2012). A Nhecolândia se distingue das outras regiões do Pantanal por sua fisiografia descrita como uma ampla planície fluviolacustre, de inundações fraca a mediana, vinculada a cursos do rio Taquari, os quais apresentam canais e leitos anastomosados, além da grande quantidade de lagoas (RADAM-BRASIL, 1982). Nesta sub-região, lagoas de água doce, denominadas baías, e lagoas salinas fazem parte de um sistema lacustre no qual baías periodicamente se conectam, e as salinas permanecem fora do alcance das cheias, mantendo-se isoladas (ABDON et al., 1998). Cerca de 12.000 lagoas rasas de água doce e lagoas salinas podem ser encontradas coexistindo muito próximas uma à outra nessa região, todas com suas próprias variabilidades físicas, químicas e biológicas (OLIVEIRA et al. 2011). Dessas lagoas, cerca de 500 apresentam alta salinidade e pH e são localmente conhecidas como “salinas” e a coexistência de lagoas de água doce e salinas ocorre principalmente no sudoeste da Nhecolândia (MARIOT et al., 2007).

3.4 As salinas do Pantanal da Nhecolândia

As salinas do Pantanal da Nhecolândia são lagoas salino-alcálicas rasas, cuja profundidade não excede 2 m, localizadas sempre em um nível topográfico mais baixo que o seu entorno. Essas lagoas não apresentam vegetação e a faixa de areia presente ao seu redor pode ter elevações de até quatro metros de altura, isolando-as da drenagem (MARIOT et al., 2007). Este ambiente possui áreas de vegetação conhecidas como cordilheiras, as quais funcionam como uma barreira natural à entrada de água superficial, sendo a lagoa abastecida exclusivamente pelos fluxos sub-superficiais do lençol freático durante a estação da cheia (MARIOT et al., 2007; QUEIROZ NETO et al., 1999). Essas lagoas são isoladas de lagoas de água doce, rios e córregos, e sua salinidade é influenciada pela evaporação da água. O nível de salinidade dessas lagoas é controlado por um sistema de limiar sub-superficial, que consiste em horizontes do solo de baixa permeabilidade resultantes de um processo de precipitação de SiO₂, que atua como uma barreira para a circulação de água para dentro ou para fora dos lagos através do subsolo (ALMEIDA et al., 2011). Essas lagoas não são habitadas por plantas aquáticas, macro invertebrados bentônicos ou peixes, restringindo sua diversidade biológica apenas a microalgas e micro-organismos (MOURÃO et al., 1988; WILLINK et al., 2000).

Tanto a origem como o funcionamento hidro-biogeoquímico dessas lagoas tem sido objeto de muitos estudos (BARBIÉRO et al., 2007; MARIOT et al., 2007; REZENDE FILHO, 2012). Sakamoto (1997) verificou que as salinas do Pantanal da Nhecolândia em épocas de cheia recebem água do lençol freático com um teor de acidez acentuado, capaz de solubilizar os sais ali presentes. Porém, quando essa água é evaporada, os sais solubilizados pela água do lençol freático permanecem no ambiente, aumentando sua concentração na lagoa. Tais processos acarretam na elevação do pH e, conseqüentemente, no aumento da condutividade elétrica. A etapa de concentração de sal depende do funcionamento hidrológico de cada lagoa.

As salinas do Pantanal foram física e quimicamente caracterizadas por possuírem águas com um perfil químico rico em NaHCO_3 , pH elevado (acima de 10) e baixo teor de cálcio e magnésio (BARBIÉRO et al., 2002; FURQUIM et al., 2008), semelhante aos lagos de soda encontrados na África (DUCKWORTH et al., 1996; JONES et al., 1998). Lagos de soda, como o nome indica, são ambientes com elevados valores de pH (9,0 – 12,0) e alta salinidade, devido a grande quantidade de carbonato de sódio (ou complexos deste sal) que são concentrados por evaporação sob as condições particulares de geologia, geografia e clima de cada ambiente (GRANT, 2003). Esses ambientes são considerados excepcionais em relação a todos os outros ecossistemas aquáticos, pois exibem simultaneamente essas características extremas à vida e apesar disso, altas taxas de produtividade. Os valores elevados de pH dos lagos de soda são mantidos devido à elevada capacidade tamponante do carbonato ou bicarbonato de sódio, que estão entre os principais ânions em solução (FOTI et al., 2007). Apesar de serem amplamente distribuídos em todo o planeta, esses ambientes ainda são pouco explorados (ANTONY et al., 2013). Os lagos de soda mais estudados são os encontrados na África, Índia, Estados Unidos, América do Sul e China (OREN, 2002; CASAMAYOR et al., 2013). Esses lagos abrigam comunidades microbianas consideravelmente diversas e muitos destes apresentam florações de microalgas e cianobactérias, podendo ser sazonais ou permanentes, muitas vezes resultando em uma coloração esverdeada da água (GRANT et al., 1990).

Algumas salinas do Pantanal brasileiro podem apresentar florações com alta abundância de cianobactérias e diatomáceas (ALMEIDA et al., 2011). Em um estudo sobre a biodiversidade e distribuição de cianobactérias na Salina do Meio (Região da Nhecolândia) observou-se uma alta riqueza de morfo-espécies de cianobactérias, com destaque para as espécies *Anabaenopsis elenkinii*, responsável por florações principalmente nos períodos de seca, e *Arthrospira platensi* (SANTOS; SANT'ANNA, 2010). Ainda no Pantanal da

Nhecolândia, um levantamento de algas e cianobactérias do plâncton de duas salinas da Fazenda Nhumirim demonstrou também a ampla ocorrência de cianobactérias nessas lagoas (MALONE et al., 2007). As cianobactérias que habitam essas salinas apresentam ampla diversidade morfológica e filogenética, (ANDREOTE et al., 2014), e novos gêneros vêm sendo descritos nesse ambiente (VAZ et al., 2015). Em lagos de soda distribuídos pelos continentes africano, americano e asiático, as florações são causadas por organismos dos gêneros: *Spirulina*, *Chroococcidiopsis*, *Nostoc*, *Cyanospira*, *Gloeocapsa*, *Nodularia*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Calothrix*, *Scytonema*, *Anabaena*, *Lamprocystis*, *Thiocapsa*, *Thiocystis*, *Chromatium*, *Amoebobacter*, *Thiospirillum*, *Rhodobacter*, *Ectothiorhodospira*, *Chamaesiphon*, *Oscillatoria* (PIKUTA; HOOVER, 2007). Contudo, estudos sobre a diversidade microbiana nas salinas do Pantanal são escassos, e, apesar da diversidade de cianobactérias nesse ambiente ter sido explorada, informações sobre outras bactérias que ali habitam continuam desconhecidas.

3.5 Biogeoquímica das salinas do Pantanal da Nhecolândia

As salinas do Pantanal sofrem alterações em sua composição química por resultado do processo evaporação da água que abastece o Pantanal anualmente, o que provoca a concentração de alguns elementos e precipitação de alguns sais (BARBIÉRO et al., 2007; MARIOT et al., 2007). A dinâmica relacionada aos elementos que compõem esses ambientes envolve uma complexa relação entre os processos biológicos, principalmente, os mediados por micro-organismos (WARREN; HAACK, 2001). Estudos sobre a comunidade microbiana em lagos de soda vem demonstrando a existência de uma grande diversidade metabólica nesse ambiente, sendo encontrados diferentes táxons desempenhando as mesmas funções, como por exemplo, oxidantes de enxofre e redutores de sulfato, nitrificantes e denitrificantes, metanotróficas e metanogênicas, fototróficas, entre outras (ANTONY et al., 2013). A ocorrência desses diversos grupos funcionais demonstra que os lagos de soda possuem diversos ciclos biogeoquímicos e interações microbianas complexas. Contudo, a ligação funcional entre os micro-organismos e seus papéis ecofisiológicos nesses ambientes ainda são pouco compreendidos.

O arsênio (As) está presente nas salinas no Pantanal da Nhecolândia em concentrações elevadas. Este elemento se origina da água doce que abastece essas lagoas e, mesmo em baixas concentrações, tem o seu teor aumentado pelo processo de evaporação da água das salinas (BARBIÉRO et al., 2007). O As possui potencial tóxico e carcinogênico, com alta

toxicidade em concentração relativamente baixa (CHEN et al., 2001), e ainda, possui alta mobilidade em água com diferentes pH (BLUM et al., 1998). A oxidação do arsenito (As III) para arseniato (As V) por bactérias é essencial no ambiente, pois o As V é menos tóxico do que sua forma As III (CAI et al., 2009). A atividade enzimática de arsenito oxidase, enzima capaz de reduzir o As, tem sido detectada em vários grupos de bactéria e arqueias (NEWMAN et al., 1998), sendo que para a produção dessa enzima são requeridos os genes *aoxA*, que codifica a subunidade maior da arsenito oxidase, e *aoxB*, que codifica sua subunidade menor (WEEGER et al., 1999). Enquanto o processo de evaporação nas salinas permite uma acumulação de As, Barbiéro e colaboradores (2011) verificaram que o mesmo não ocorre para o mercúrio (Hg) e selênio (Se), sendo baixas as concentrações desses elementos. Em ambientes aquáticos, o Hg pode ser liberado para a atmosfera na forma elementar ou pela sua metilação, sendo que estes dois processos podem ser mediados por micro-organismos (MIRANDA et al., 2007). Se o mercúrio elementar é formado, ele será evaporado e um novo ciclo começa. Se metilmercúrio é formado, ocorre bio-acumulação e rápida translocação através da cadeia alimentar (DASH; DAS, 2012). Devido à diversidade de micro-organismos envolvidos na transformação de Hg, sugere-se que eles exerçam um papel importante no ciclo do mercúrio no ambiente (ROBINSON; TUOVINEN, 1984). Apesar da alta toxicidade do Hg, muitos micro-organismos desenvolveram mecanismos de resistência a esse metal, a qual está relacionada à presença do operon *mer* (SILVER; HOBMAN, 2007). Bactérias que possuem o operon *mer* são capazes de reduzir enzimaticamente o mercúrio II, forma catiônica e altamente reativa, para a forma volátil e menos tóxica de mercúrio, Hg^0 (BARKAY et al., 2003). O gene *merA* codifica a enzima mercúrio redutase, responsável pela redução do mercúrio (BROWN et al., 2003). O Se, por sua vez é um micronutriente essencial aos organismos pertencentes aos três domínios, porém em concentrações elevadas torna-se tóxico (ZHANG et al., 2008). A redução de Se nas formas dos oxianions selenato e selenito para a forma elementar é um processo biológico importante realizado por bactérias (SIDDIQUE et al., 2005). A redução do selênio pode ser catalisada pela enzima selenato redutase que possui três subunidades codificadas pelos genes *serA*, *serB* e *serC* (BÉBIEN et al., 2002).

A dinâmica do nitrogênio nas salinas do Pantanal também é um aspecto interessante, pois se apresenta como um fator limitante ao metabolismo microbiano nesses ambientes (SANTOS, 2013; MOURÃO, 1989), diferentemente da maioria dos sistemas aquáticos em que o fator limitante geralmente é o fósforo (REBOLÇAS et al., 2006). Mourão (1989) demonstrou que a razão nitrogênio inorgânico dissolvido/nitrogênio total nesse ambiente é

baixa, sugerindo que apenas uma fração mínima de 1% do nitrogênio presente se encontra na forma disponível para a atividade metabólica, e, portanto, espécies com estratégias para fixar outras formas nitrogenadas seriam favorecidas neste ambiente (SANTOS, 2013). A entrada deste elemento nas salinas está relacionada ao abastecimento de água subterrânea que entra em pequena quantidade nas lagoas, decomposição da matéria orgânica, e fixação biológica, sendo os dois últimos processos mediados por micro-organismos (MEDINA-JÚNIOR; RIETZLER, 2005). Os processos relacionados ao ciclo do nitrogênio nas salinas do Pantanal ainda são desconhecidos. No ambiente, existe uma inter-relação complexa entre as diferentes formas que o nitrogênio se encontra (amônio, nitrato, nitrito, entre outras) e seus mecanismos de transformação, sendo que uma vasta gama de micro-organismos é capaz de utilizá-lo nas mais diferentes formas de compostos orgânicos e minerais, participando efetivamente de sua ciclagem (SOUZA et al., 2012). Compreender as interações e as diferentes vias dos processos de transformação do nitrogênio nas salinas é um essencial para entender a importância relativa desse elemento na estrutura e funcionamento desse ecossistema.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo e amostragem

O presente estudo foi realizado na região conhecida como Pantanal da Nhecolândia, no estado do Mato Grosso do Sul (Figura 1). Para avaliar os grupos bacterianos que habitam esses ambientes, duas salinas foram estudadas, ambas localizadas na fazenda Centenário ao norte da cidade de Aquidauana, MS. As salinas estudadas são regionalmente conhecidas como Salina Verde e Salina Preta (Figura 1). A Salina Verde (19°28'13"S, 56° 3'22"W) tem forma alongada com divertículo, uma área de 0,15 km², um nível de água variando entre 0,1 a 1,5 m, dependendo da estação seca ou chuvosa e se caracteriza por apresentar florações constantes de microalgas e cianobactérias (Figura 2). A Salina Preta (19°26'56"S, 56° 7'55"W) possui forma arredondada, uma área de 0,09 km², nível de água que varia de 1,2 a 2,5 m e nunca apresenta florações visíveis (Figura 3). Ao redor das duas salinas encontra-se uma praia contendo solo arenoso. A praia ao redor da Salina Verde é extensa e sem vegetação, enquanto na Salina Preta a praia é menor e apresenta vegetação arbustiva e gramínea. A distância geográfica entre as duas lagoas é de 8,3 km, os quais compreendem cordilheiras com vegetação típica do Pantanal, lagoas de água doce, algumas áreas que sofrem inundação na estação chuvosa, além de outras salinas.

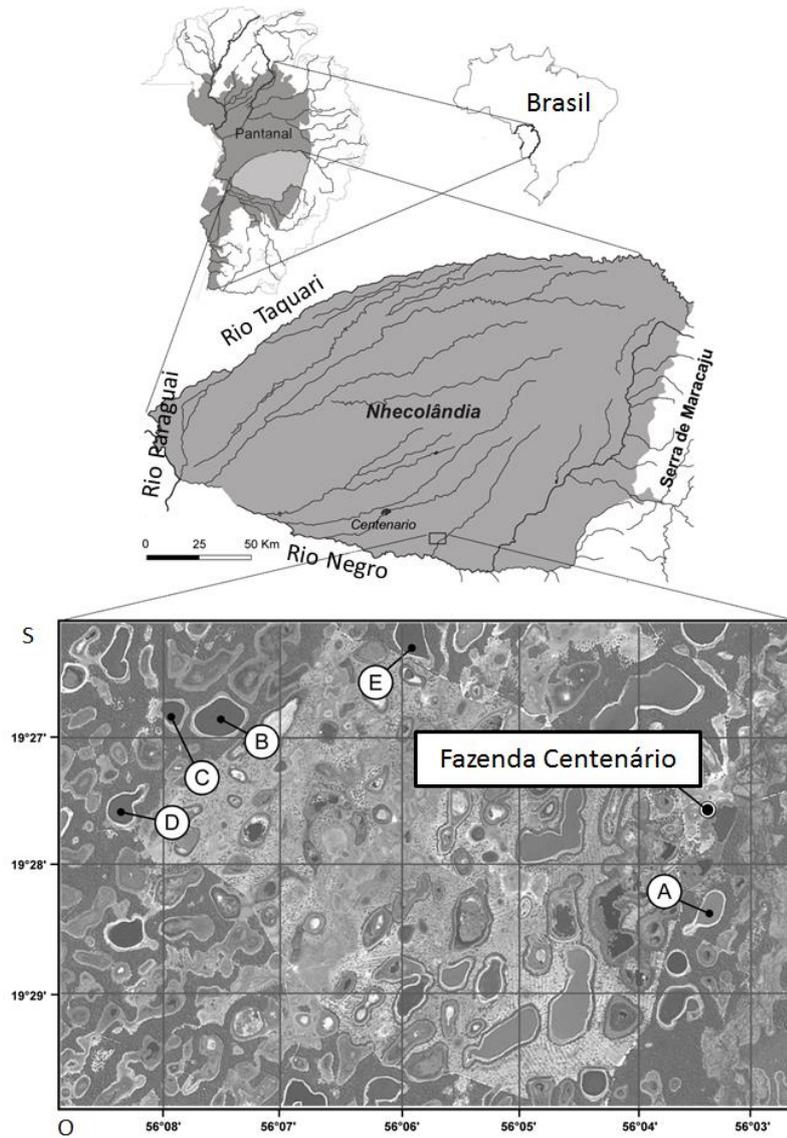


Figura 1 - Localização das salinas estudadas. Salina Verde (A) e Salina Preta (C)
Adaptado de Andreote et al. (2014)

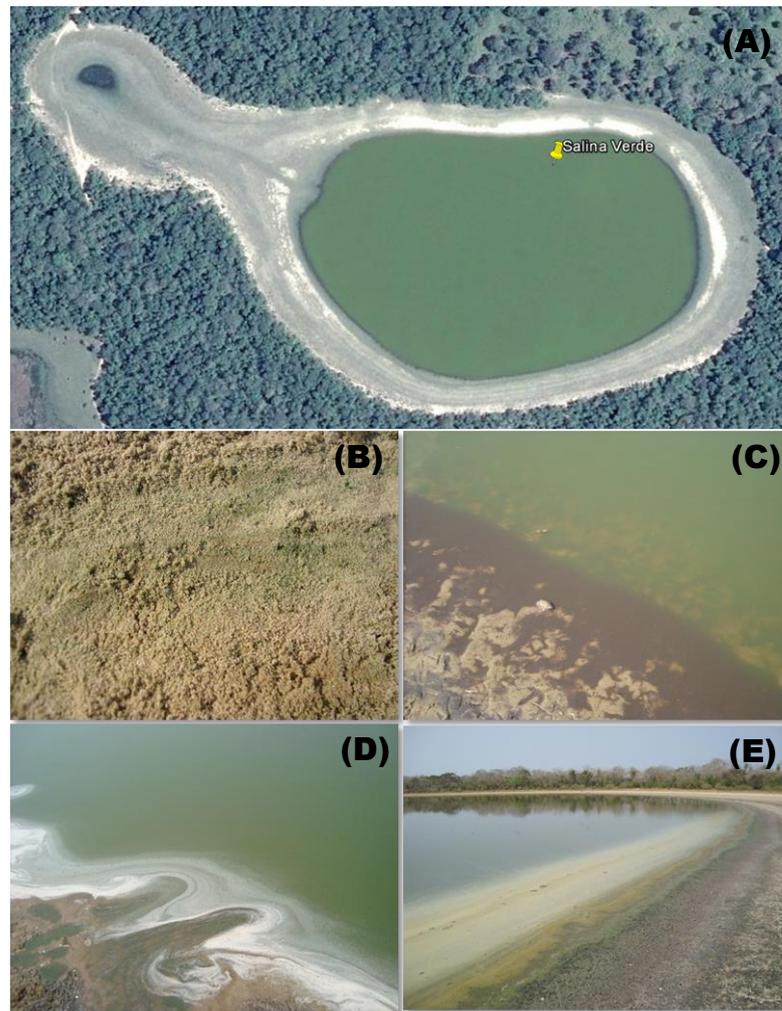


Figura 2 - Imagem aérea da salina verde, Pantanal da Nhecolândia, MS. Fonte: Google Earth, 2014 (A); Solo arenoso da praia (B); Coloração esverdeada da água devido à floração (C e D); Praia com ausência de vegetação (E)

Créditos: Diego B. Genuário e Marcelo G.M.V. Vaz



Figura 3 - Imagem aérea da salina preta, Pantanal da Nhecolândia, MS. Fonte: Google Earth, 2014 (A); Coloração escura da água (B); Praia com presença de arbustos e gramíneas (C)
Créditos: Diego B. Genuário e Marcelo G.M.V. Vaz

As coletas foram realizadas ao final da estação seca (setembro de 2012), pelo grupo do Laboratório de Biologia Celular e Molecular/Ecologia Molecular de Cianobactérias, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA-USP), em parceria com o Dr. Laurent Barbiéro, durante atividades referentes ao projeto “Os Pantanais: interações água-solo nas sub-regiões do Pantanal” (FAPESP 2009/53524-1). Triplicadas das amostras de água (50 mL) foram coletadas em duas profundidades: na superfície (interface água-atmosfera); e no fundo (interface água-sedimento); e em dois horários distintos: 10h00min e 15h00min. Esses horários foram selecionados devido a um fenômeno observado na salina verde quanto a variações nas concentrações de O₂ dissolvido. No período da tarde ocorre uma saturação de O₂ dissolvido gerando um borbulhamento na água da salina Verde (ALMEIDA et al., 2011). As amostras coletadas foram acondicionadas em frascos esterilizados, mantidas em isopores contendo gelo e protegidas da luz, e conduzidas até o laboratório no CENA-USP, em Piracicaba/SP, onde foram concentradas por centrifugação a 9.000 rpm por 5 min e mantidas a -20 °C.

4.2 Características físico-químicas das salinas

As características físico-químicas foram medidas *in situ* durante a coleta, no interior das salinas a aproximadamente 60 centímetros da borda. Foram estimados ao longo de um dia, com medidas a cada hora, os seguintes parâmetros: pH (utilizando um pHmêtro modelo HI 98140), a condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) e a temperatura (°C) com um termômetro/condutivímetro modelo HI 9838, a turbidez da água (ntu - unidade de medição de

turbidez que indica a intensidade da luz espalhada em um ângulo de 90° da luz incidente) com um turbidímetro modelo HI 98703 e o oxigênio dissolvido (%) com o oxímetro modelo HI 9148, todos os instrumentos da HANNA Instruments Inc. (EUA).

A análise da composição química da água (macro e micronutrientes) foi feita em parceria com o Laboratório de Ecologia Ambiental e Geoprocessamento, CENA-USP.

4.3 Extração do DNA total

A extração do DNA total das amostras foi realizada com o *kit Power Soil DNA Isolation* (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras previamente centrifugadas foram acondicionadas em tubos esterilizados e foi adicionada a solução *C1* contendo SDS e outros agentes degradantes que, juntamente com agitação, realizam a lise celular e degradam compostos associados à membrana celular, tais como ácidos graxos e lipídios. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo esterilizado e foi adicionada a solução *C2*, que possui reagentes que precipitam ácido húmico, restos celulares e proteínas, de modo que apenas os ácidos nucleicos permanecem em solução. A mistura foi homogeneizada, incubada a uma temperatura de 4 °C, centrifugada, e o sobrenadante foi acondicionado em um novo tubo. Com o objetivo de conferir maior pureza ao DNA, foi adicionada ao sobrenadante a solução *C3* e repetiu-se o procedimento realizado com a solução *C2*. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo uma coluna de purificação de sílica e foi adicionada a solução *C4*, que possui alta concentração de sal, seguido por centrifugação e descarte da fase eluída. Em condições de alta salinidade, o DNA liga-se fortemente a sílica. O DNA aderido à coluna foi lavado com a solução *C5*, que é uma solução de lavagem com base de etanol, usada para remover resíduos tais como sais, ácido húmico e outros contaminantes. Após a lavagem, a coluna foi colocada em um novo tubo, e o DNA foi eluído com a solução *C6* que é um tampão de eluição estéril. A integridade dos DNAs extraídos foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), com coloração por *Sybr Green* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e visualização em luz UV. A quantificação dos DNAs foi realizada pela comparação com o marcador de massa molecular *Low Mass DNA Ladder* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). O DNA extraído foi armazenado a -20 °C até as próximas etapas.

4.4 Quantificação dos genes 16S RNAr e *nifH*

A técnica de PCR quantitativo (qPCR) foi utilizada para estimar a abundância das comunidades bacteriana total e cianobacteriana e também a comunidade diazotrófica bacteriana total e cianobacteriana presentes em ambas as salinas. As reações de PCR foram realizadas em duplicatas utilizando o sistema de detecção SYBR GreenI (Corbett Life Science, Austrália), no equipamento RotorGene 6000 (Corbett Life Science, Austrália), em colaboração com o laboratório de Microbiologia Molecular (ESALQ/USP) coordenado pelo professor Márcio Rodrigues Lambais. As reações foram realizadas em duplicatas, com volume final de 10 µL, contendo 5 µL do kit Platinum® SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 0,2 µM de cada iniciador e 10 ng de DNA.

O gene que codifica a subunidade menor do ribossomo (16S RNAr) foi utilizado para acessar a abundância da comunidade bacteriana por PCR. As amplificações do fragmento do gene 16S rRNA bacteriano foram realizadas com os iniciadores P1 (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') e P2 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (MUYZER et al., 1993), que amplificam um fragmento de 180 pb. A amplificação ocorreu com desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30s, pareamento a 55 °C por 30s e extensão final a 72 °C por 30s. Para acessar as cianobactérias, foram utilizados os iniciadores específicos para esse filo: 359F (5'-GGGGAATYTTCCGCAATGGG-3'), e os reversos 781aR (5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCAT-3') e 781bR (5'-GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T-3') (NÜBEL et al., 1997), que produzem um produto de ~400 pb. A ciclagem térmica realizou-se com uma desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30s, 55 °C por 30s e 72 °C por 30s.

Para avaliar a abundância do gene *nifH* bacteriano deste ambiente, foram utilizados os iniciadores FGPH19 (5'-TACGGCAARGGTGGNATHG-3') (SIMONET et al. 1991) e PolR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3') (POLY et al. 2001), que geram um produto de 429 pb. A ciclagem térmica foi de desnaturação inicial a 95 °C por 15 min, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, pareamento a 55 °C por 1 s e extensão a 72 °C por 1 min. Para avaliar o número de cópias do gene *nifH* apenas das cianobactérias presentes, foram utilizados os iniciadores específicos Olson F (5'-CGTAGGTTGCGACCCTAAGGCTGA-3') e Olson R (5'-GCATACATCGCCATCATTTACC-3') (OLSON et al., 1998), que produzem um produto de 325 pb. As condições de amplificação foram 95 °C a 2 min; 35 ciclos 94 °C a 1 min, 47 °C a 1 min, 72 °C a 1 min; extensão final a 72°C/7min.

Em todas as reações de amplificação, uma curva de desnaturação foi construída, com temperaturas variando de 72 a 96 °C para verificar a especificidade da amplificação, como sugerido por Bustin e colaboradores (2009). Curvas padrões foram obtidas para cada uma das quatro reações a partir da amplificação de amostras com concentração conhecida (0,000001 a 1 ng) dos fragmentos alvo e gerada uma relação linear entre o número de cópias do gene alvo e os respectivos valores do limiar da fluorescência - valor calculado do Cycle Threshold (Ct) ($R^2 > 0,95$ em todos os casos). As curvas geradas foram comparadas com as amostras para a quantificação do número de cópias do gene por mL de água das amostras ambientais. A aquisição dos dados foi realizada pelo programa *Rotor Gene Real Time Analysis 1.7.65* (Corbett), onde foram obtidos os valores de Ct e a correlação logarítmica (R^2) entre o número de ciclos e a quantidade de DNA das amostras.

4.4 Pirosequenciamento do gene 16S RNAr

A técnica de pirosequenciamento foi aplicada com o objetivo de se caracterizar a estrutura das comunidades, assim como identificar os grupos bacterianos presentes nas salinas estudadas. As 24 amostras de DNA (8 tratamentos com 3 repetições) foram utilizados na amplificação da região V4 do gene 16S rRNA usando o iniciador direto 520F (5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3') e uma mistura equimolar de iniciadores reversos 802R (5'-TACCRGGGTHCTAATCC-3', 5'-TACCAGAGTATCTAATTC-3', 5'-CTACDSRGGTMTCTAATC-3', 5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3'), como sugerido pelo *Ribosomal Data Project – RDP* (<http://pyro.cme.msu.edu/pyro/help.jsp>). Aos iniciadores diretos foram adicionados adaptadores específicos para a plataforma de sequenciamento 454, conforme instruções do fabricante (Roche, EUA), e uma etiqueta de identificação (*barcode*) composta por 8 nucleotídeos, para a posterior identificação das amostras.

A reação de PCR foi realizada em solução contendo: tampão para PCR 1X; 2 mM de $MgCl_2$, 2,5 mM de dNTP, 1,5 U de Taq DNA polimerase; 10 μ M de cada iniciador e cerca de 40 ng de DNA total, para um volume final de 50 μ L. Um controle negativo da reação foi elaborado contendo todos os reagentes exceto DNA. As condições térmicas da reação foram: desnaturação inicial de 3 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 s, pareamento a 57 °C por 1 min e 45 s, extensão a 72 °C durante 4 min, e extensão final a 72 °C durante 4 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 % (m/v) e comparados com o marcador molecular Low Mass DNA Ladder (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para avaliar o tamanho e quantificação do fragmento. Os produtos de

PCR das 24 amostras foram unidos em quantidades equimolares e purificados utilizando o *kit PCR Clean-up* (Life Technologies/Invitrogen) e enviados para sequenciamento em sequenciador automatizado Roche 454 com sistema GS FLX Titanium (Roche, EUA).

O processamento, filtragem e análise das sequências foram realizados usando o programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) versão 1.8.0 (CAPORASO et al., 2010b). Primeiramente, as sequências foram filtradas por tamanho (excluídas as menores que 200 pb e maiores que 400 pb) e qualidade (foram removidas aquelas com escore de qualidade menor que 25 e com homopolímeros maiores que 6 nt). Os dados foram então agrupados por amostra e posteriormente foram removidas as sequências dos iniciadores. As sequências foram submetidas a uma limpeza por *Denoiser* (REEDER; KNIGHT, 2010), com o objetivo de reduzir erros comuns de sequências obtidas pela plataforma 454 como longas leituras de homopolímeros. As sequências filtradas foram então checadas quanto à ocorrência de quimeras e estas foram removidas utilizando-se o programa *ChimeraSlayer* (HAAS et al., 2011). As sequências foram então agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) a um nível de identidade de 97% usando UCLUST, e a sequência mais abundante foi escolhida como representativa de cada UTO. As sequências representativas de cada UTO foram alinhadas usando *PyNAST* (CAPORASO et al., 2010a) e classificadas pelo RDP Classifier utilizando-se o Ribosomal Database Project (RDP) incluído no QIIME e a árvore filogenética foi construída pela ferramenta *FastTree* (PRICE et al., 2009).

Uma Tabela das UTO foi construída e rarefeita ao limite de 1693 sequências, valor determinado pela amostra com a menor quantidade de sequências. Ainda utilizando-se o QIIME, foram estimados os valores de cobertura para avaliar a suficiência amostral (CHAO; LEE, 1992), o número de espécies observadas em cada amostra (CHAO, 1984), os parâmetros de diversidade ChaoI e Shannon (CHAO; SHEN, 2003) e construídas curvas de rarefação. A composição das comunidades bacterianas das salinas foi comparada usando as métricas de distância weighted/unweighted UniFrac visualizadas em gráficos tridimensionais por Análises de Coordenadas Principais (PCoA).

4.5 Análise metagenômica das salinas

4.5.1 Construção e sequenciamento da biblioteca metagenômica

A análise metagenômica foi utilizada neste estudo para fornecer informações integrando os dados taxonômicos e funcionais acerca da comunidade microbiana presente nas salinas.

O preparo das bibliotecas metagenômicas foi realizado com o *kit Nextera XT DNA Sample Preparation* (Illumina, Inc. EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Para tal, foi utilizado 1 ng do DNA total de cada amostra, o qual foi fragmentado utilizando o *kit Amplicom Tagment Mix e Tagment DNA Buffer* a 55 °C por 5 min que, simultaneamente, aos fragmentos de sequências gerados, acoplaram adaptadores. A solução obtida foi neutralizada com a solução fornecida *Neutralize Tagment Buffer*.

A amplificação randômica dos fragmentos obtidos por PCR foi realizada com iniciadores contendo etiquetas (*tags*) de identificação para cada uma das amostras e o reagente *Nextera PCR Master Mix*, ambos fornecidos pelo kit. A ciclagem térmica utilizada foi de 72 °C por 3 min, desnaturação inicial a 95 °C por 30 s, seguida de 12 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 s, pareamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72° C por 30 s, extensão final de 72 °C por 5 min. O produto obtido na amplificação foi purificado com o *kit AMPure XP Beads* (Beckman Coulter, Inc., Canadá), que remove os reagentes residuais, incluindo fragmentos menores que 100 pb, o que favorece a seleção de fragmentos de 300 a 500 pb (CLARKE et al., 2014). As bibliotecas de fragmentos obtidas a partir de cada uma das 24 amostras foram normalizadas utilizando os reagentes fornecidos pelo kit *Library Normalization Additives 1, Library Normalization Beads 1, Library Normalization Wash 1, Library Normalization Storage Buffer 1* e 0,1 N de NaOH, que permitiram a obtenção de quantidades equimolares de DNA de cada uma das amostras para que fossem agrupadas em um *pool*. Esse *pool* de bibliotecas foi diluído em um tampão de hibridização fornecido (*Hybridization Buffer*), submetido a aquecimento para desnaturação das fitas de DNA a 96 °C por 2 min, seguidos por choque térmico em gelo. Os fragmentos foram então sequenciados na plataforma Illumina MiSeq (Illumina, Inc. EUA) utilizando o *kit MiSeq Reagent Kit V3* (Illumina, Inc., EUA) no laboratório de Biotecnologia Animal (ESALQ/USP) coordenado pelo professor Luiz Lehmann Coutinho.

4.5.2 Processamento e análise das sequências metagenômicas

A partir do sequenciamento metagenômico, foram verificadas sobreposições nos pares de leituras dos fragmentos e geradas sequências consenso pelo programa Flash (*Fast Length Adjustment of Short Reads*) versão 1.2.7 (<http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>). Posteriormente, foi realizada uma filtragem com o programa Seqclean 1.3.12 (<http://cores.ibest.uidaho.edu/software/seqclean>) removendo sequências com bases com escore de qualidade Phred menor que 20 e tamanhos menores que 50 pb. O arquivo gerado ao final dos procedimentos foi submetido à anotação automática pelo programa MG-RAST

(*Metagenomes Rapid Annotation using Subsystem Technology* - <http://metagenomics.anl.gov>), versão 3.3.6 (MEYER et al., 2008). Utilizando o servidor MG-RAST, com um cutoff de $E < 1 \times 10^{-5}$ e um mínimo de identidade de 80%, as sequências foram comparadas com os bancos de dados M5NR e SEED para análises taxonômicas e funcionais, respectivamente. Análises comparativas da diversidade microbiana das salinas estudadas foram realizadas utilizando as sequências dos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* correspondentes ao banco de dados M5NR. O perfil metabólico das amostras foi gerado através da abundância normalizada de sequências que obtiveram correspondência (*matches*) com o banco de dados SEED Project (AZIZ et al., 2008). A organização e montagem de vias metabólicas foram realizadas com auxílio do banco de dados KEGG-Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KANEHISA, 1997) disponível no servidor MG-RAST. Para isso, foram utilizados os perfis funcionais das salinas analisados por comparação com o banco SEED e mapeados utilizando o banco KEGG para hierarquizar as vias metabólicas e apresentar a informação sobre os genomas e genes preditos.

4.5.3 Detecção de genes específicos

Foi avaliada a presença de metabolismo dos elementos: nitrogênio, arsênio, mercúrio e selênio nas salinas. Para entender a dinâmica do nitrogênio nessas salinas, foram selecionados genes de referência associados aos processos de transformações desse elemento mediados por micro-organismos. Os genes selecionados foram: *ureA* que codifica a subunidade beta da enzima urease envolvida no processo de mineralização do nitrogênio; os genes *nifH* e *nifD* que codificam a enzima nitrogenase, envolvidos na fixação biológica de nitrogênio; o gene *amoA* que codifica a enzima amônia mono-oxigenase, envolvido no processo de oxidação de amônia de *Archaea* (AOA) e *Bacteria* (AOB); *narG* e *napA* que codificam a enzima nitrato redutase, *nirA*, *nirB*, *nirK* e *nirS* - enzima nitrito redutase, *norB* - enzima óxido nítrico redutase, *nosZ* - enzima óxido nitroso redutase, todos envolvidos no processo de desnitrificação.

Devido ao fato de haver um acúmulo de Arsênio e uma perda de Mercúrio e Selênio nas salinas estudadas (BARBIÉRO et al., 2011), a ocorrência de genes microbianos associados à ciclagem desses elementos foi avaliados. Os genes selecionados como referência foram: *aoxA* e *aoxB*, que codificam as subunidades menor e maior da enzima arsenito oxidase, respectivamente; *merA* que codifica a enzima mercúrio redutase; *serA* que codifica a enzima selenato redutase. As sequências de referência para esses genes foram selecionadas no

banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para todos esses genes, sequências referência foram obtidas no banco de dados FunGene – *The Functional Gene Pipeline and Repository* (<http://fungene.cme.msu.edu/>) (FISH et al., 2013). As sequências de referência utilizadas como referência foram filtradas para no mínimo 90% de *HMM Coverage*, porcentagem pelo modelo HMM que corresponde à sequência da proteína codificada pelo gene. A detecção dos genes foi realizada no programa *CLC Genomics Workbench* versão 6.5.1 (CLCBio, Dinamarca). Para isso, as sequências obtidas foram confrontadas com o conjunto de dados de genes de referência previamente selecionados, considerando sequências com um mínimo de 80% de identidade. Além disso, foram estimadas as quantidades de cada gene, bem como quais os táxons possivelmente responsáveis por essas funções.

4.5 Análises estatísticas

A correlação entre a estrutura da comunidade bacteriana obtida pelo pirosequenciamento e as características físico-químicas das salinas foi examinada por análise multivariada utilizando o programa CANOCO versão 4.5 (Biometris, Holanda). Primeiramente foi realizada uma análise de correspondência destendenciada (DCA) que indicou uma linearidade nas distribuições dos dados (tamanho do gradiente <3). Assim, uma análise multivariada de redundância (RDA) associada ao teste de Monte Carlo ($p < 0,05$) com 499 permutações, foi utilizada para avaliar a significância dos atributos abióticos sobre a comunidade bacteriana nas salinas estudadas.

Os índices de riqueza e diversidade calculados a partir do pirosequenciamento foram submetidos a uma análise de variância e o teste Tukey a 5% de significância foi utilizado para a comparação das médias dos diferentes tratamentos, utilizando o programa SASM-Agri versão 8.2 (CANTERI et al., 2001).

Para determinar as diferenças estatísticas entre as salinas estudadas a partir dos dados obtidos no pirosequenciamento e no sequenciamento metagenômico, foi utilizado o programa STAMP-Statistical Analysis of Metagenomic Profiles (PARKS; BEIKO, 2010). Para os dados obtidos no pirosequenciamento foi utilizada a Tabela de UTO contendo o número de vezes que cada UTO é encontrado em cada amostra, e para o sequenciamento metagenômico foi utilizada a Tabela do perfil metabólico das salinas, contendo a frequência que cada metabolismo foi encontrado em cada amostra. As Tabelas foram submetidas

separadamente a análise de variância (ANOVA) e um teste de comparação múltipla por Tukey-Kramer ($p < 0,05$), e construído um dendrograma de similaridade usando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). Comparações de médias de duas amostras independentes foram realizadas pelo teste Welch ($p < 0,05$) para melhor visualização das distinções entre as salinas estudadas.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação das características físico-químicas das salinas

Parâmetros relativos à composição físico-química das águas das salinas Verde e Preta foram avaliados *in situ* durante a coleta. As variáveis observadas foram: saturação de oxigênio (em %), pH, condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), turbidez (NTU) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (Figura 4).

Os valores de saturação de oxigênio apresentaram grande variabilidade entre as salinas estudadas, sendo que ao longo do dia na Salina Preta esses valores variam de 80% a 107%. Na Salina Verde, esses valores variam de 7% a 600% as 14h00min, indicando alta atividade biológica nas salinas durante o dia, com grande produção e liberação de O_2 devido à intensa atividade fotossintética realizada pelas microalgas e cianobactérias causadoras da floração observada na Salina Verde.

Os valores de PH e condutividade elétrica (CE) estão relacionados às características extremas desse ambiente e se apresentaram relativamente estáveis ao longo do dia. O PH da Salina Verde apresentou um valor médio de 9,5 ao longo do dia e a Salina Preta 8,9 no período da manhã e 8,8 a tarde. A CE é a capacidade da água em conduzir uma corrente eléctrica, que é diretamente relacionada com a concentração de sais em solução. A Salina Verde apresentou um valor médio de CE de $2575 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ durante a manhã, e $2750 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ durante a tarde. A Salina Preta, $1444 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ durante a manhã e $1594 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ durante a tarde. Enquadrando estes valores na Classificação de Salinidade proposta por Richards (1954), essas águas são classificadas como salinas ou hipersalinas (CE acima de $750 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$).

O índice de turbidez da Salina Verde apresentou variação ao longo do dia com valores de 830 NTU, durante a manhã e 940 NTU no período da tarde. Os valores encontrados na Salina Preta se apresentaram mais estáveis ao longo do dia, uma média de 90 NTU, valor bem abaixo da Salina Verde, sendo que o alto índice de turbidez desta pode estar relacionado às florações de cianobactérias. A temperatura da água também apresentou variações ao longo do dia nas duas salinas. A Salina Preta apresentou a menor temperatura, 27 $^{\circ}\text{C}$, as 02h00min e a maior, 33 $^{\circ}\text{C}$, as 15h00min. A Salina Verde apresentou a menor temperatura do dia, 23 $^{\circ}\text{C}$, as 07h00min e a maior, 38 $^{\circ}\text{C}$, as 13h00min.

Em relação aos nutrientes, observou-se que não houve diferença na quantidade dos ânions Cloreto, Nitrito, Sulfato e do cátion Cálcio, porém a Salina Verde apresentou maiores quantidades dos ânions Nitrato e Fosfato, e dos cátions Sódio, Amônio, Potássio e maior

alcalinidade que a Salina Preta, enquanto esta apresentou maiores quantidades apenas do cátion Magnésio (Tabela 1).

Tabela 1 - Variáveis químicas das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro

Variável (mmol·L⁻¹)	Salina Preta	Salina Verde
Cl ⁻	1,49	1,64
NO ₂ ⁻	0,009	0,005
SO ₄ ²⁻	2,02	2,33
NO ₃ ⁻	0,012	0,06
PO ₄ ³⁻	0,006	0,0283
Na ⁺	11,4	18,346
NH ₄ ⁺	0,001	0,6
K ⁺	4,39	8,246
Mg ²⁺	0,21	0,149
Ca ²⁺	0,36	0,353
Alcalinidade	10,6	22,5

*Alcalinidade: quantidade dos íons bicarbonatos (HCO₃⁻), carbonatos (CO₃⁻) e hidróxidos (OH⁻) presentes na água, capazes de neutralizar íons de hidrogênio

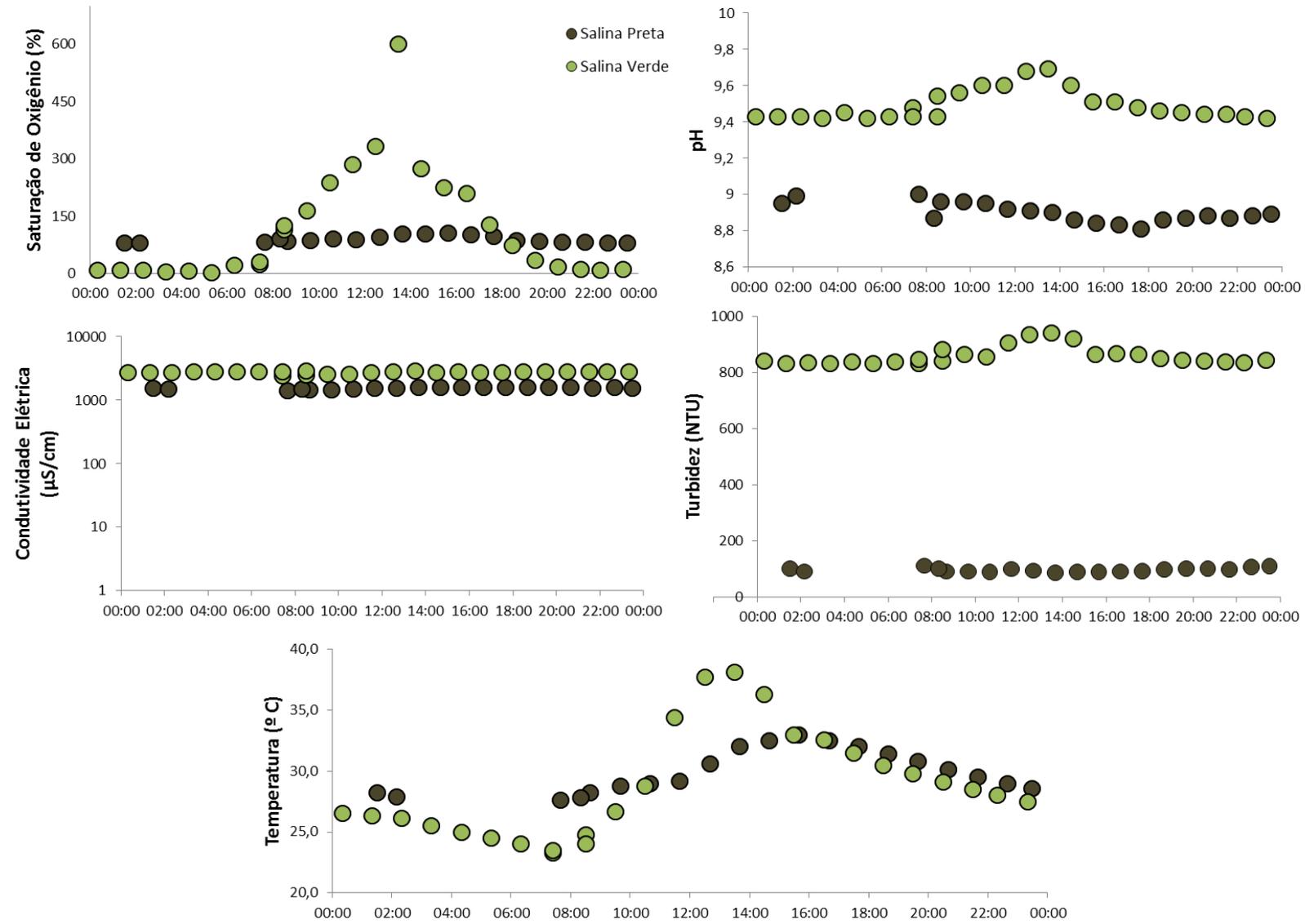


Figura 4 - Características físico-químicas avaliadas *in situ* durante a coleta nas salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro

5.2 Abundância da comunidade bacteriana e cianobacteriana nas salinas

Com análises de PCR quantitativo (qPCR) foi possível estimar o número de cópias do gene 16S RNAr de células bacterianas e cianobacterianas presentes nas duas salinas estudadas. A eficiência (E) das reações foi acima de 0.9 e os valores de regressão logarítmica (R^2) obtidos nas curvas padrões foram de 0,98 para o gene de 16S RNAr de Cyanobacteria, e de 0,99 para o gene 16S RNAr de bactérias totais.

A maior abundância de bactérias foi encontrada na Salina Verde, sendo dez vezes maior que o valor encontrado na Salina Preta, 10^{10} e 10^9 cópias do gene de 16S rRNA·mL⁻¹, respectivamente. Na Salina Verde, não houve variações na abundância da comunidade bacteriana ao longo do dia, ou na superfície e fundo da lagoa. Por outro lado, na Salina Preta, durante a manhã os valores de abundância da superfície e fundo da lagoa foram similares, porém durante a tarde, houve uma diminuição na abundância de bactérias da superfície e aumento na quantidade no fundo da lagoa (Figura 5).

Devido à ocorrência de floração na salina Verde, a abundância do filo Cyanobacteria foi também determinada. Como esperado, as cianobactérias foram mais abundantes na Salina Verde do que na Preta, independente das variáveis de profundidade e período de amostragem, sendo sua abundância estimada em cerca de 100 cópias do gene 16S RNAr·mL⁻¹ a mais na Salina Verde em relação à salina Preta (Figura 5). Alterações ao longo do dia, na superfície e fundo não foram observadas. Por outro lado, na Salina Preta foi possível observar que na superfície da lagoa no período da tarde há um aumento da quantidade de cianobactérias, mesmo havendo uma redução no número de bactérias totais (Figura 5).

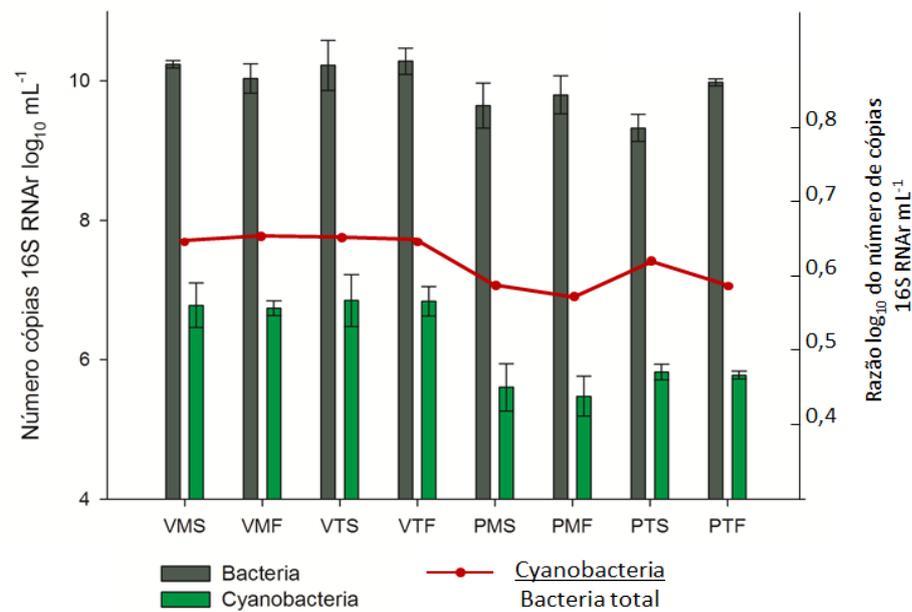


Figura 5 - Abundância de Bactéria total e Cyanobactéria estimadas por qPCR nas salinas Verde e Preta no Pantanal, MS, Brasil. As barras de erro indicam o desvio padrão de abundâncias relativas entre as três repetições

5.3 Pirosequenciamento do gene 16S rRNA

Utilizando a técnica de pirosequenciamento foram obtidas 256.170 sequências da região V4 do gene 16S rRNA. Utilizando o programa QIIME, após limpezas e filtragens por qualidade restaram 224.913 sequências de aproximadamente 300 pb, com uma média de 9.370 sequências por amostra. Com esse conjunto de dados, para análise da comunidade microbiana, as sequências foram agrupadas em 2.837 UTOs a um *cutoff* de 97% de identidade. Os valores de cobertura são apresentados na Tabela 2, e revelaram boa representatividade da diversidade de bactérias encontradas nos ambientes estudados.

Tabela 2 - Número de sequências obtidas pelo pirosequenciamento e estimativa de cobertura para cada uma das 8 amostras analisadas (média de três repetições)

Amostra	Nº Sequências	Cobertura* (%)
VMS	9855	97.8
VMF	16865	96.0
VTs	18366	97.9
VTF	14169	97.3
PMS	3664	94.0
PMF	2596	87.6
PTS	2322	95.1
PTF	7133	84.5

V: Salina Verde; P: Salina Preta; M: manhã; T: tarde; S: Superfície; F: fundo

*Cobertura = $1/(N_x/n)$, N_x é o número de sequências únicas; n é o número total de sequências

5.4 Composição taxonômica da comunidade bacteriana das salinas

A classificação taxonômica das sequências permitiu determinar a composição da comunidade bacteriana nas salinas estudadas. As salinas Verde e Preta apresentaram 35 filios bacterianos em comum, porém, a abundância destes grupos foi diferente entre elas. A Salina Verde apresentou sequências afiliadas a 42 filios bacterianos, 92% das sequências foram afiliadas ao filo Cyanobacteria, seguida do filo Proteobacteria (média de 3%) e os demais filios com menos de 1 % das sequências. Na Salina Preta foram encontradas sequências correspondentes a 39 filios bacterianos, sendo a comunidade predominante pertencente aos filios Proteobacteria (aproximadamente 34%), Bacteroidetes (13%), Acidobacteria (12%) e Verrucomicrobia (7%). Cerca de apenas 1% das sequências foi classificada como Cyanobacteria nessa salina (Figura 6).

Considerando-se as afiliações ao nível de gênero, pode-se observar uma comunidade bacteriana mais estruturada na Salina Preta, sem a predominância de um grupo específico. Na Salina Verde, observou-se dominância do gênero *Anabaenopsis* na floração de cianobactérias (Apêndice A).

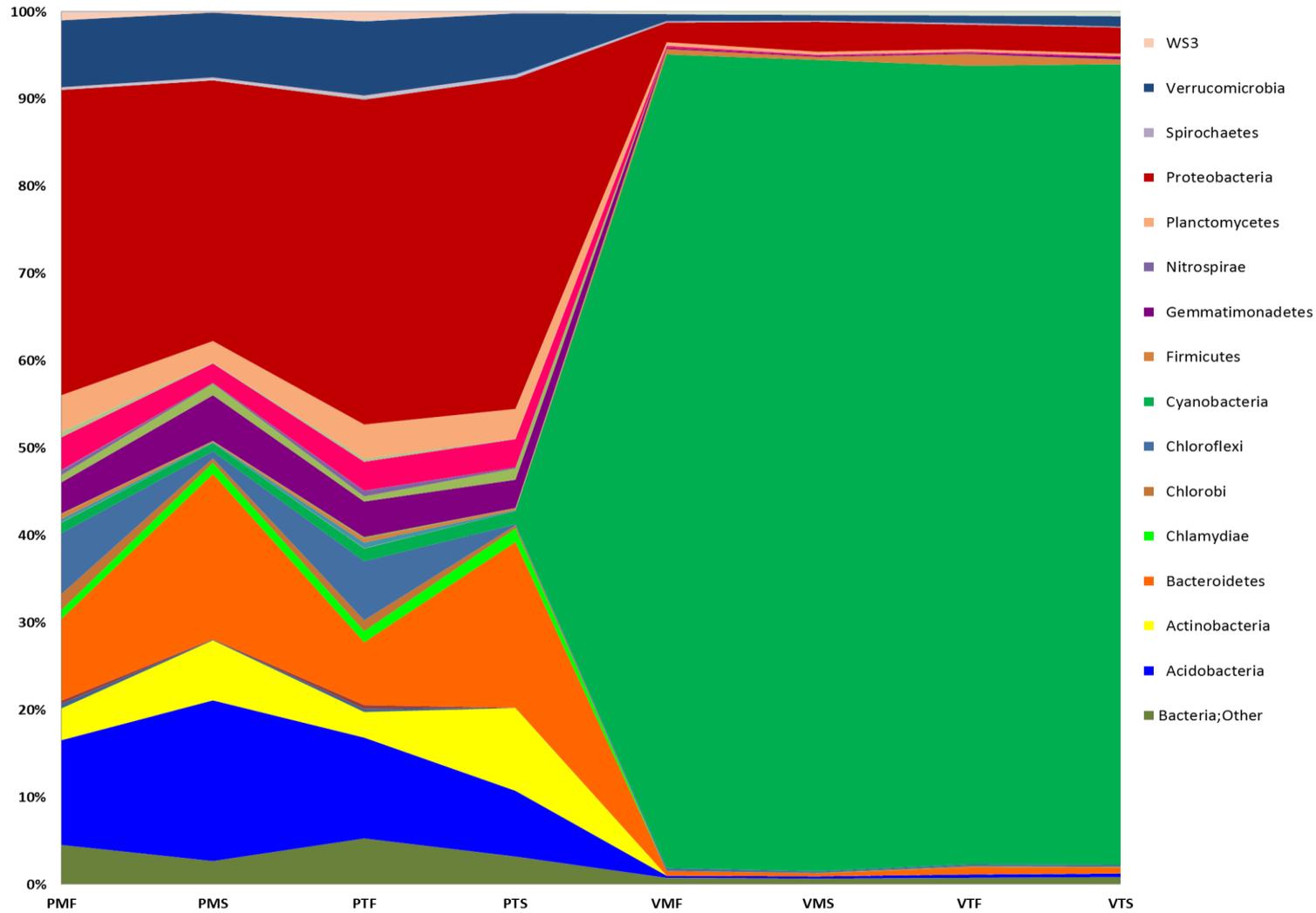


Figura 6 - Abundância dos diferentes filios bacterianos encontrados nas salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro. Classificação realizada utilizando o programa QIIME, com o sistema de classificação RDP. (Média de três repetições)

5.5 Relação entre a comunidade bacteriana e as variáveis ambientais observadas

A análise de correspondência destendenciada (DCA) revelou que apenas a alcalinidade ($p=0,042$, $F=397$), pH ($p=0,434$, $F=1.07$) e temperatura ($p=0,840$, $F=0,21$) das lagoas correlacionam-se com a composição das comunidades bacterianas, sugerindo não haver influência das demais características físico-químicas avaliadas. A análise multivariada de redundância (RDA) associada ao teste de Monte Carlo ($p<0,05$) mostrou que pH e alcalinidade das salinas estão diretamente relacionados à ocorrência dos filos *Thermi*, *Cyanobacteria* e *Spirochaetes*, e inversamente relacionadas aos filos *Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *NKB19*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Chlamydiae*. A temperatura das salinas está diretamente relacionada com organismos não classificados. Em relação às amostras como um todo, o teste também demonstrou uma separação das comunidades. As amostras da salina Verde apresentaram-se diretamente relacionadas com pH e alcalinidade. Por sua vez, as amostras da salina Preta separaram-se pelo horário da coleta, de modo que as amostras coletadas no período da tarde apresentam-se diretamente relacionadas com a temperatura das lagoas, enquanto que as amostras da manhã apresentam-se opostamente relacionadas à temperatura (Figura 7).

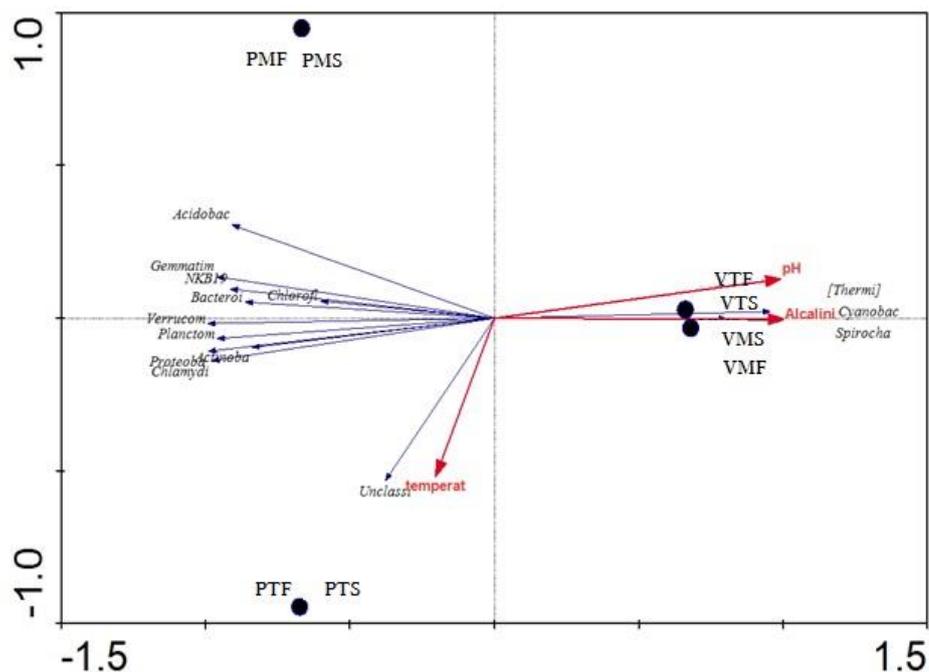


Figura 7 - Análise multivariada de redundância (RDA) associada ao teste de Monte Carlo ($p<0,05$) da composição da comunidade bacteriana e variáveis ambientais das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro

5.6 Diversidade da comunidade bacteriana nas salinas Verde e Preta

Para as análises de diversidade, devido aos diferentes números de sequências de cada amostra, foi feita uma normalização com um *cutoff* de 1.693 sequências, determinado pelo menor número de sequências encontrado em uma amostra. A Salina Preta apresentou riqueza de espécies e diversidade superior à Salina Verde. Na Salina Preta os valores de Chao1 variaram de 338 a 934, enquanto que na Salina Verde esses valores foram de 116 a 185. O índice de diversidade também foi maior na Salina Preta, com uma variação de 5,94 até 7,87. Na Salina Verde esses valores variaram de 0,75 a 0,92. Na Salina Verde não houve variação nos índices de riqueza e diversidade dos pontos amostrados. Na Salina Preta, independente do horário da coleta, os maiores valores de riqueza de espécies e diversidade foram encontrados no fundo das lagoas (Tabela 3). As curvas de rarefação baseadas nas espécies observadas (UTOs) das salinas Verde e Preta apresentam-se diferentes. As amostras da Salina Preta apresentaram maior número de espécies que as amostras da Salina Verde (Figura 8).

Para acessar a β -diversidade das salinas estudadas, foi utilizada a métrica UniFrac por Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Observa-se nas PCoA a formação clara de grupos distintos das amostras de cada salina, Verde e Preta, o que confirma a diferença da comunidade bacteriana entre as lagoas. A explicação da variação total das comunidades microbianas pelas versões *unweighted* e *weighted* foram de 54% e 97% respectivamente, representando de forma robusta as similaridades e diferenças encontradas nas amostras (Figuras 9 e 10).

Quando observados os agrupamentos formados a partir das variáveis de coleta em cada salina (manhã/tarde e superfície/fundo), as amostras da Salina Verde permanecem agrupadas, o que evidencia a homogeneidade da comunidade bacteriana nessa lagoa. Na Salina Preta, observa-se diferença na comunidade bacteriana que está na superfície e no fundo da lagoa, independente do horário da coleta, demonstrando que as diferentes profundidades contribuíram na composição da comunidade bacteriana dessa salina.

Tabela 3 - Índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) das comunidades bacterianas das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro, baseados no resultado de pirosequenciamento. (Média de três repetições – médias comparadas pelo teste Tukey $p < 0,05$)

Amostra	Chao1	Shannon
VMS	116 ^d	0,75 ^c
VMF	181 ^d	0,81 ^c
VTS	135 ^d	0,89 ^c
VTF	185 ^d	0,92 ^c
PMS	396 ^c	5,94 ^b
PMF	770 ^b	7,50 ^a
PTS	338 ^c	6,43 ^b
PTF	934 ^a	7,87 ^a

Legenda: V: Salina Verde; P: Salina Preta; M: manhã; T: tarde; S: Superfície; F: fundo

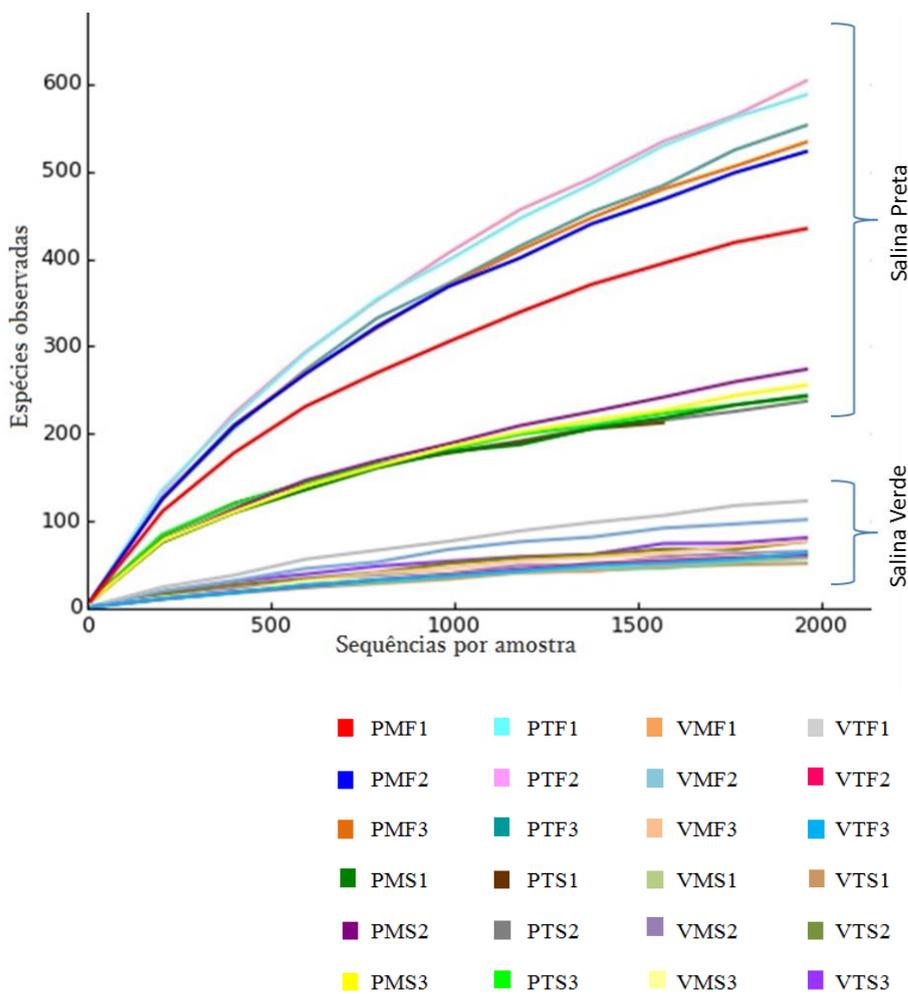


Figura 8 - Curva de rarefação construída com o número de espécies observadas (UTOs) das salinas do Pantanal brasileiro, baseada no resultado do pirosequenciamento do gene 16S RNAr

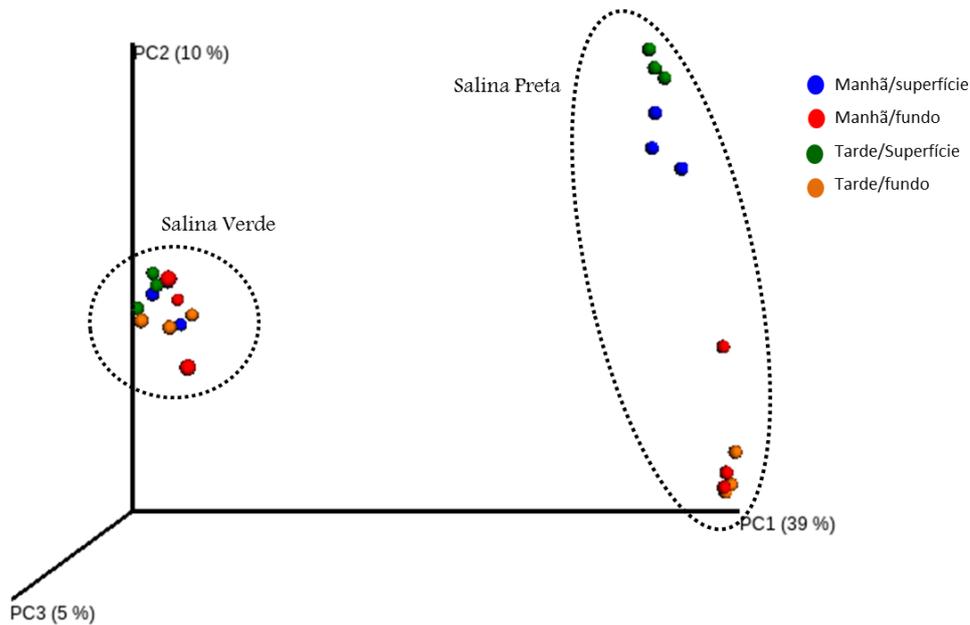


Figura 9 - Análise de Coordenada Principal (PCoA) de pela métrica UniFrac versão *unweighted* da comunidade bacteriana das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro

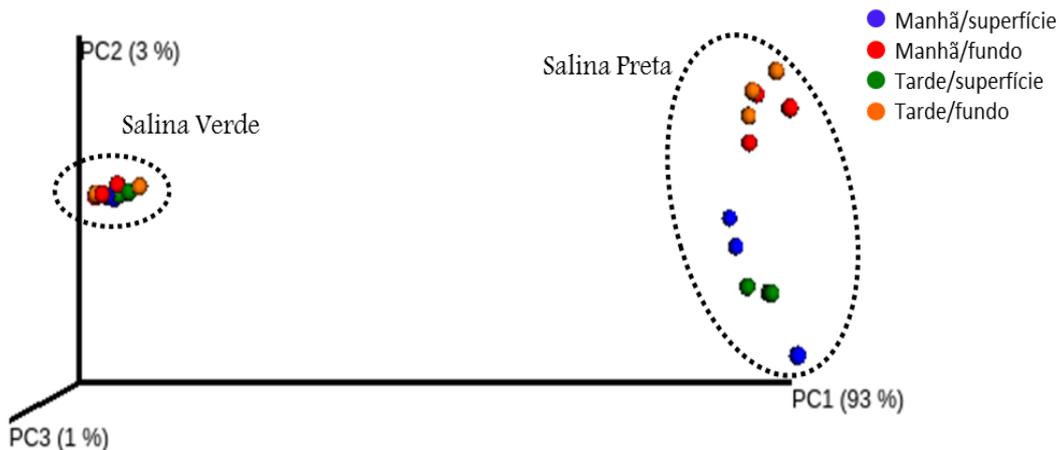


Figura 10 - Análise de Coordenada Principal (PCoA) de pela métrica UniFrac versão *weighted* da comunidade bacteriana das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro

Para determinar diferenças estatísticas dos grupos que compõem as comunidades bacterianas das salinas Verde e Preta, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) e um teste de comparação múltipla por Tukey-Kramer ($p < 0,05$). O teste foi feito com todas as UTOs e, devido ao número elevado de sequências (2.837), foram selecionadas as 50 UTOs com os menores valores de *p-value*, que correspondem aos grupos bacterianos significativamente distintos entre as comunidades das duas salinas. Com as UTOs

selecionadas foi realizada uma análise de agrupamento microbiano baseado em *heatmap* a partir da comparação múltipla por Tukey-Kramer ($p < 0,05$) ao nível de filo e construído um dendrograma de similaridade usando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*). Pode-se observar no dendrograma formado na parte superior do *heatmap* que houve a separação entre os principais filos das salinas Verde e Preta (Figura 11), resultado também observado nas PCoA realizadas com todas as UTOs das comunidades bacterianas das salinas, o que confirma a distinção entre as comunidades bacterianas das salinas Verde e Preta.

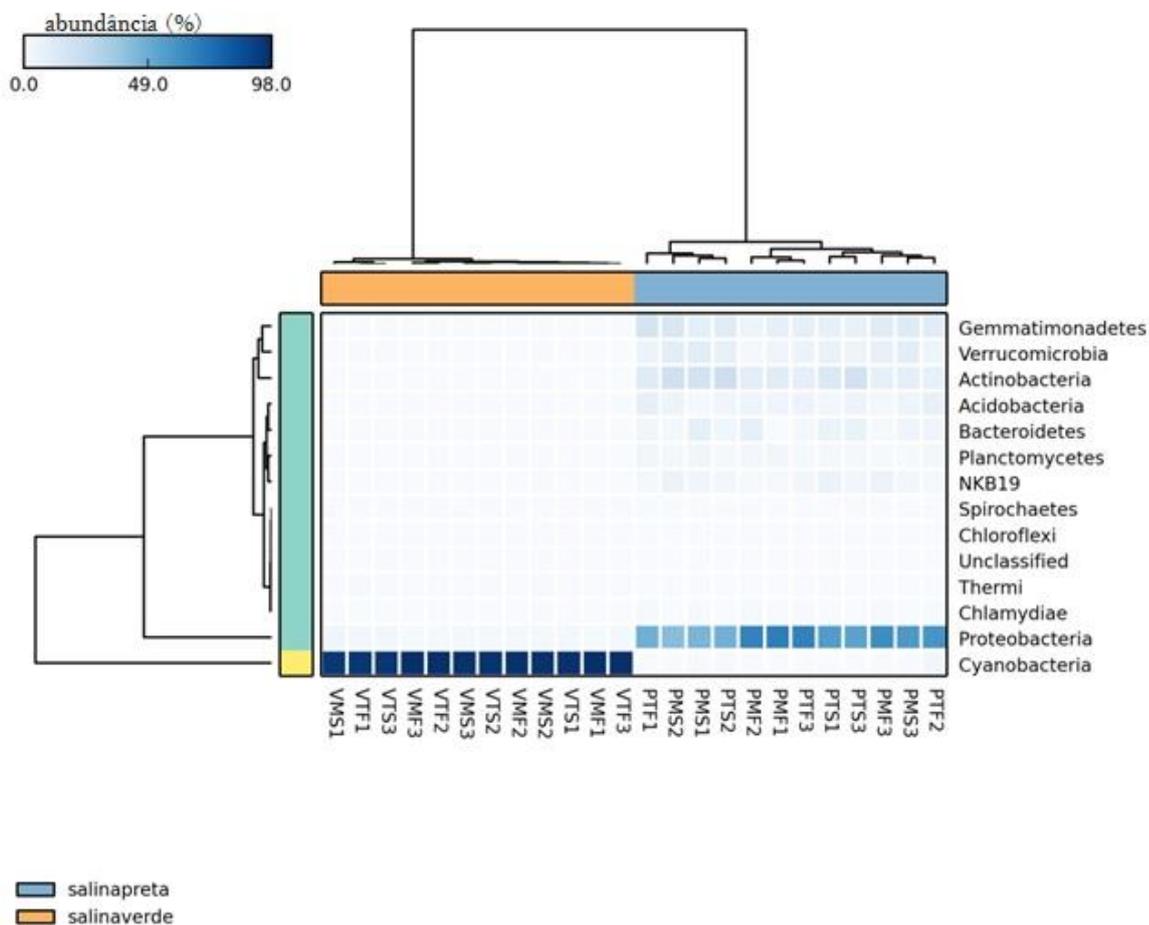


Figura 11 - Análise de agrupamento (*heatmap*) ao nível de filo baseado perfil das comunidades bacterianas das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro a partir da comparação múltipla por Tukey-Kramer ($p < 0,05$)

As médias da abundância de cada um dos principais filos das comunidades bacterianas das salinas Verde e Preta foram confrontadas pela comparação de médias de duas amostras independentes pelo teste Welch ($p < 0,05$) para melhor visualização das distinções entre as lagoas. Observou-se uma diferença significativa entre 14 filos das comunidades bacterianas

das salinas, sendo observada na salina Verde a predominância dos filos Cyanobacteria, Thermi, Spirochaetes, Chloroflexi e organismos não classificados. Na salina Preta ocorre a predominância dos filos Proteobacteria, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Acidobacteria, Chlamydiae, NKB19 e Bacteroidetes (Figura 12).

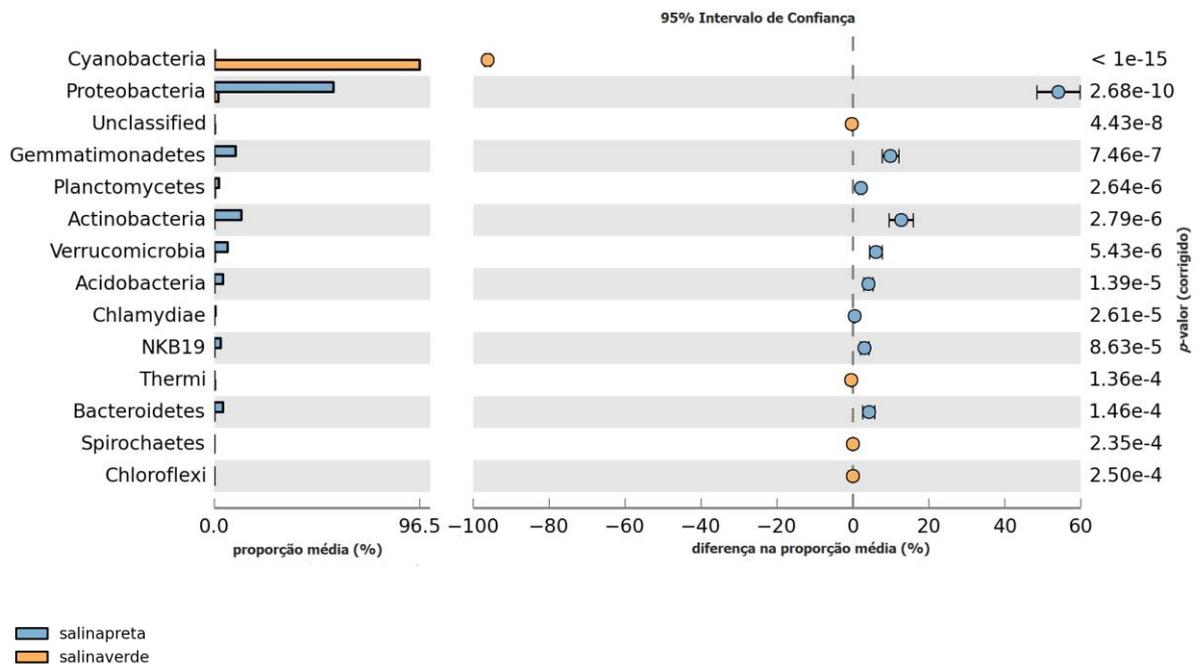


Figura 12 - Comparação das médias de abundância dos principais filos das comunidades bacterianas das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro pelo teste Welch ($p < 0,05$)

Nas PCoAs, foram observadas distinções entre a comunidade bacteriana da superfície e fundo da salina Preta, enquanto que a Verde mostrou-se homogênea. De tal modo, foi realizada também a comparação das médias de abundância pelo teste Welch ($p > 0,05$) dos principais filos da superfície e fundo da salina Preta, para conferir os grupos predominantes nas diferentes profundidades.

Foram observadas diferenças significativas em 4 filos entre a superfície e fundo da salina Preta. Na superfície, foram predominantes os filos Actinobacteria e Verrucomicrobia, enquanto os filos Chlamydiae e Proteobacteria foram mais abundantes no fundo da lagoa (Figura 13).

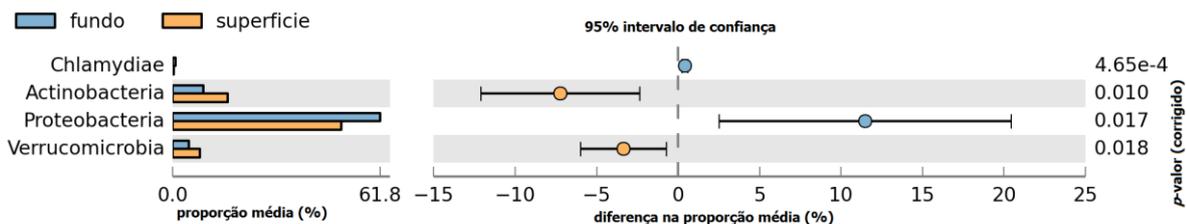


Figura 13 - Comparação das médias de abundância dos principais filos da superfície e fundo da comunidade bacteriana da salina Preta pelo teste Welch ($p > 0,05$)

5.7 Perfis taxonômicos e funcionais obtidos pelo sequenciamento metagenômico (*shotgun*)

Integralmente, pelo sequenciamento metagenômico foram obtidas 13,5 milhões de sequências. Após a filtragem por qualidade e obtenção das sequências consenso pela sobreposição dos fragmentos, obteve-se 10,6 milhões de sequências com média de 500 pb, sendo 4,0 milhões de amostras da salina Preta e 6,5 milhões de amostras da salina Verde. Devido a variações no volume de dados gerados por amostra, os dados foram normalizados para uma frequência de 0 a 1, para uma melhor compreensão dos resultados.

Na avaliação do perfil taxonômico das bibliotecas metagenômicas, observou-se que nas salinas Verde e Preta houve uma predominância de organismos do domínio *Bacteria*, mas também foram encontradas sequências correspondentes a *Archaea*, *Eukarya* e *Virus* (Figura 14).

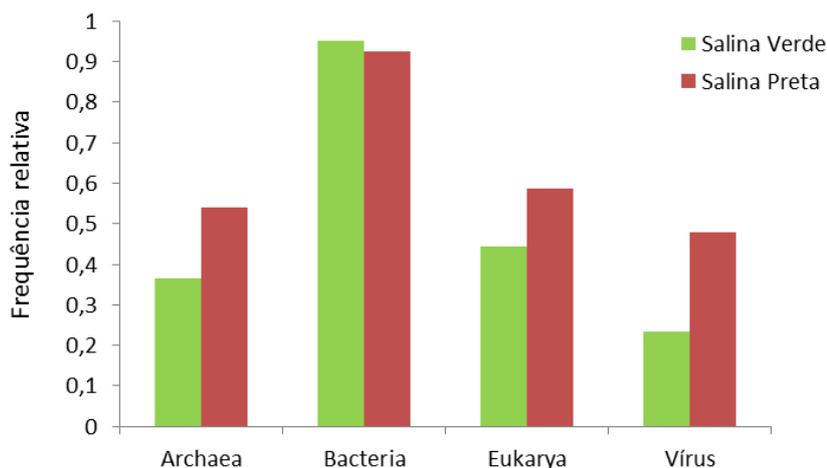


Figura 14 - Frequência relativa da afiliação taxonômica das sequências obtidas das bibliotecas metagenômicas das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro

Em relação aos domínios com representantes microbianos, na salina Preta foram encontradas sequências afiliadas a 3 filós do domínio *Archaea*, 28 filós de *Bacteria* e 6 filós de *Eukarya*. Na salina Verde foram observadas sequências afiliadas a 6 filós de *Archaea*, 28 de *Bacteria* e 32 filós de *Eukarya* (Apêndice B). Foram encontrados os mesmos filós do domínio *Bacteria* nas amostras das salinas Verde e Preta, porém a frequência relativa das sequências foi diferente (Figura 15). Na salina Preta, observou-se a predominância dos filós Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria, enquanto que na salina Verde observou-se o domínio de Cyanobacteria, seguido por Proteobacteria e Bacteroidetes (Apêndice C).

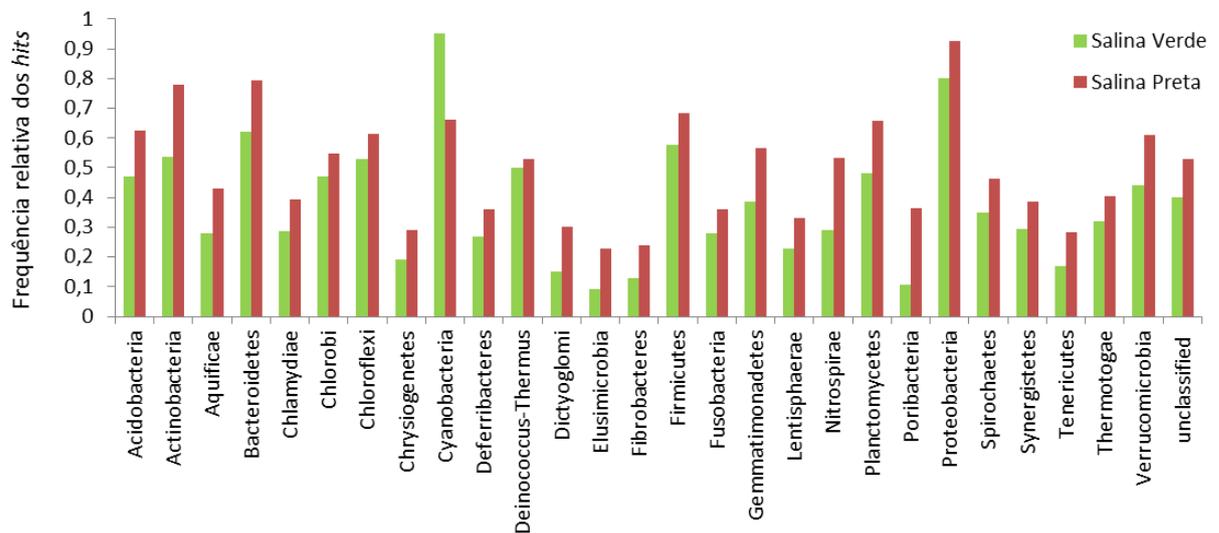


Figura 15 - Frequência relativa das sequências de bactérias afiliadas ao nível de filo das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro

Os perfis funcionais das salinas Verde e Preta foram analisados de acordo com o banco de dados SEED. Foram encontradas sequências correspondentes a 28 grupos funcionais (Figura 16).

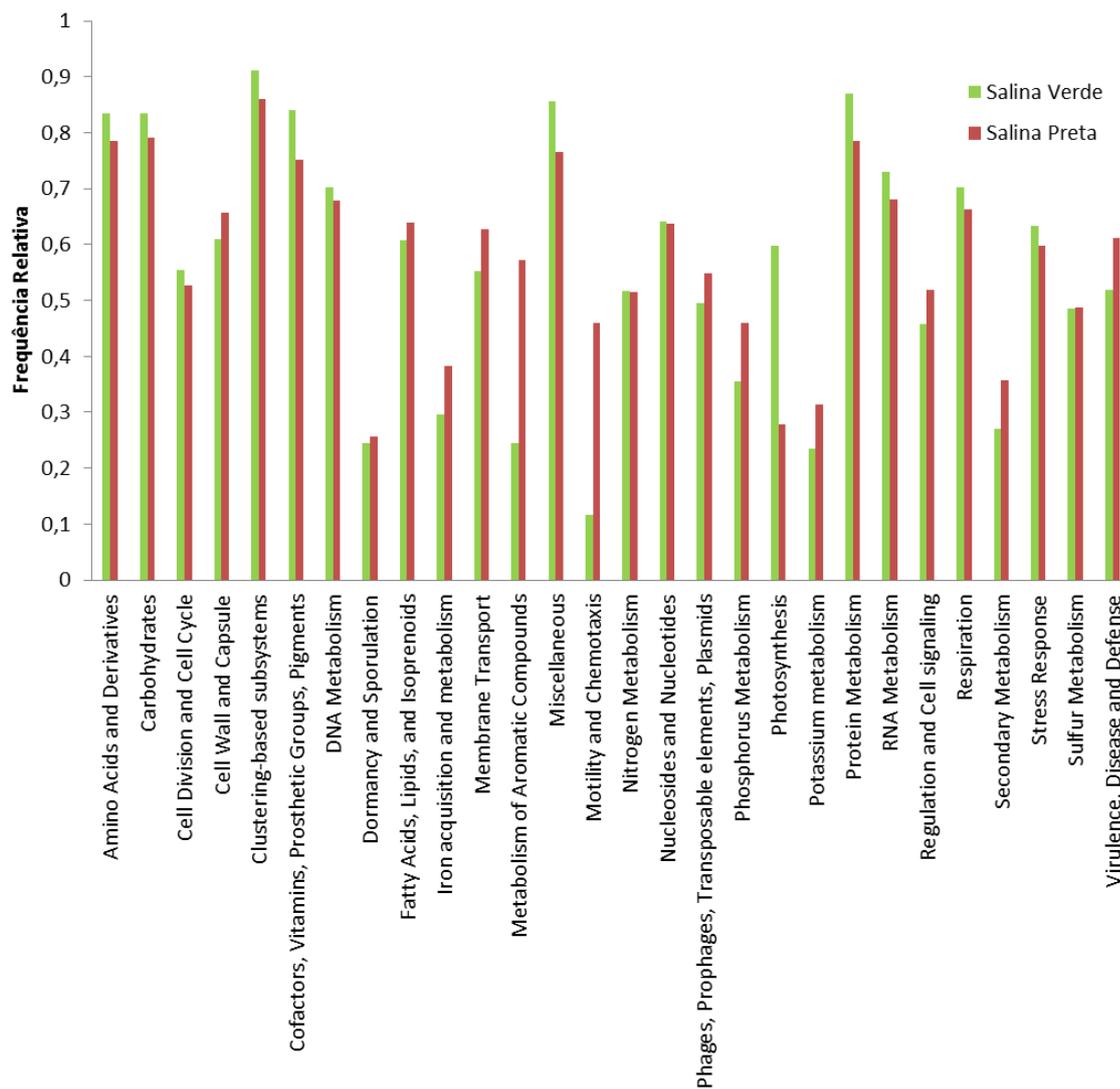


Figura 16 - Perfis funcionais obtidos pelo sequenciamento metagenômico das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro

Os perfis funcionais das comunidades microbianas das salinas, quando comparados por uma análise de agrupamento baseado em *heatmap* a partir da comparação múltipla por Tukey-Kramer ($p < 0,05$) e construído um dendrograma de similaridade dos perfis usando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), demonstrou que não há uma separação clara entre os grupos funcionais encontrados nas salinas Verde e Preta (Figura 17). Para testar essa hipótese, as frequências relativas de cada um dos grupos funcionais encontrados nas salinas Verde e Preta foram confrontadas pela comparação de médias de duas amostras independentes pelo teste Welch ($p < 0,05$) para melhor visualização das distinções entre as mesmas.

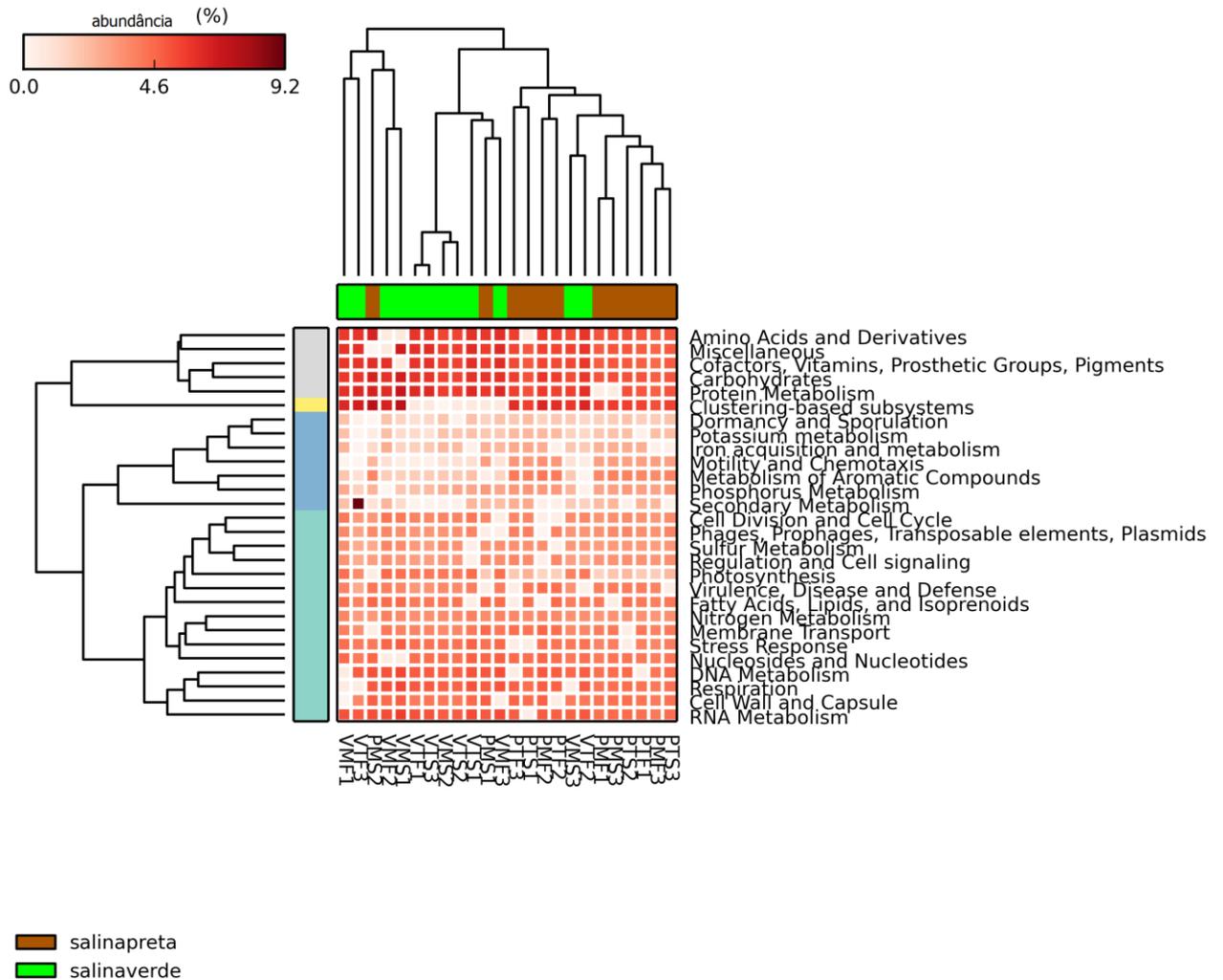


Figura 17 - Análise de agrupamento (*heatmap*) baseado no perfil funcional das comunidades microbianas das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro a partir da comparação múltipla por Tukey-Kramer ($p < 0,05$)

Dos grupos funcionais encontrados, apenas 8 mostraram diferença significativa entre as salinas Verde e Preta. Na salina Preta foram dominantes os processos de motilidade e quimiotaxia, metabolismo de compostos aromáticos e metabolismo de fósforo. Na salina Verde, os processos de fotossíntese, carboidratos, resposta a estresse, metabolismo de proteína e de RNA foram predominantes. Não houve diferença significativa entre os grupos funcionais da superfície e fundo das salinas, bem como no horário da coleta (Figura 18).

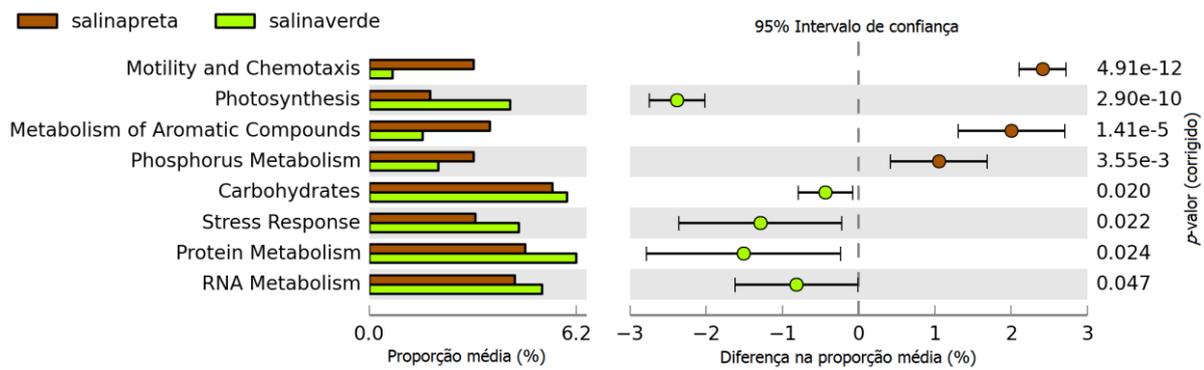


Figura 18 - Comparação das frequências relativas dos grupos funcionais encontrados na comunidade microbiana das salinas Verde e Preta pelo teste Welch ($p > 0,05$)

Os perfis funcionais analisados mapeados baseadas no banco de dados do KEEG possibilitou uma visão geral das vias metabólicas presentes nas salinas Preta e Verde obtidas pelo sequenciamento metagenômico. As sequências da salina Preta foram mapeadas e apresentaram uma maior variabilidade de vias metabólicas sendo a maior parte relacionada a metabolismos de aminoácidos, de carboidratos, energéticos e de lipídios. As sequências da salina Verde mapearam principalmente metabolismos energéticos e de biossíntese de metabólitos secundários (Figura 19).

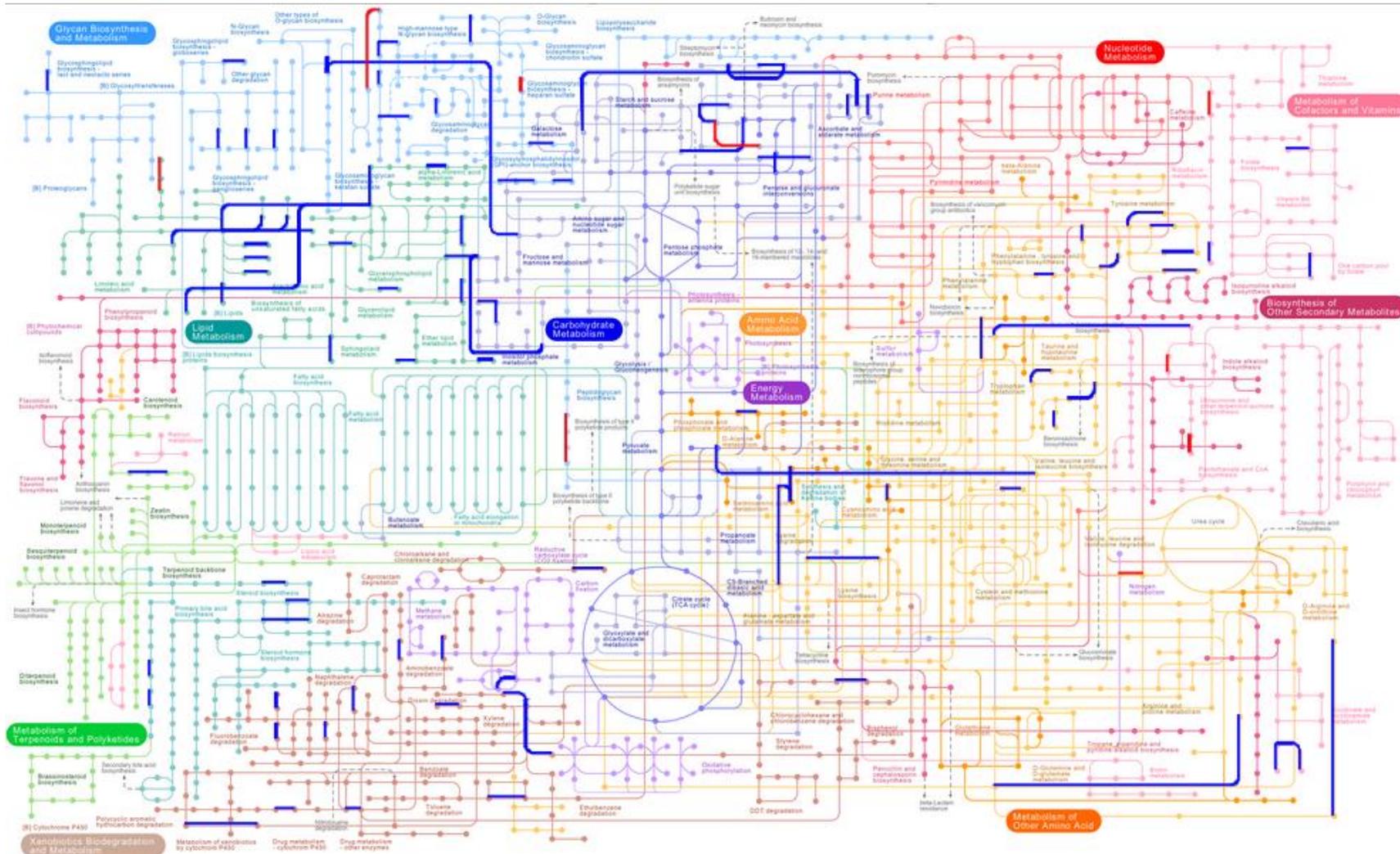


Figura 19 - Mapa das vias metabólicas (KEGG) baseado no sequenciamento metagenômico das salinas Verde (vias em vermelho) e Preta (vias em azul) do Pantanal brasileiro

5.8 Busca por genes microbianos envolvidos na ciclagem de arsênio, mercúrio e selênio

Devido à acumulação de arsênio e perda de mercúrio e selênio observada nas salinas do Pantanal, foram buscados genes microbianos descritos na literatura e conhecidos por atuarem no ciclo biogeoquímico destes elementos.

Em relação ao arsênio, na salina Verde foram encontradas 70 sequências correspondentes ao gene *aoxA*, afiliadas taxonomicamente aos gêneros *Sinorhizobium* e *Agrobacterium*. Na salina Preta foi encontrada uma sequência relacionada ao gene *aoxB* afiliada a um organismo não cultivável e 22 ao gene *aoxA* afiliadas aos gêneros *Thiomonas*, *Sinorhizobium* e *Agrobacterium*. Os genes *aoxAB* codificam a enzima arsenito oxidase, utilizada por alguns grupos de bactérias e arqueias em seu metabolismo para redução do arsênio. A presença desses genes microbianos nas salinas pode estar relacionada com o acúmulo do elemento (Figura 20).

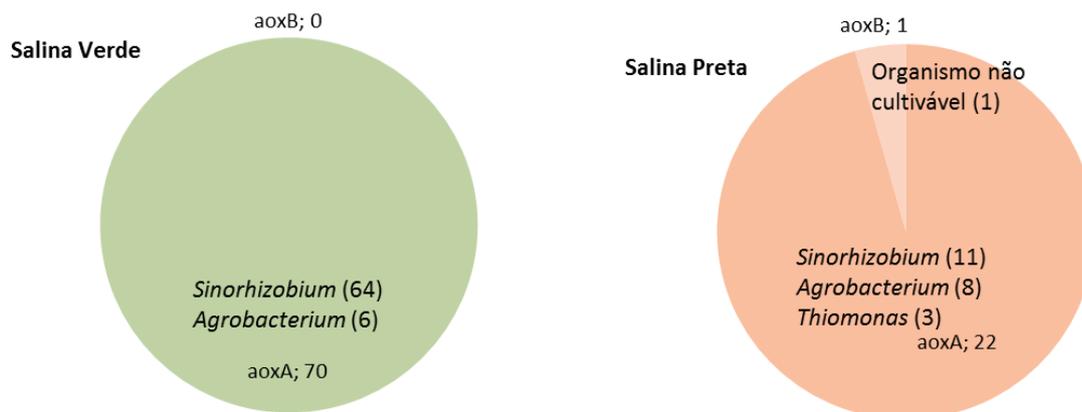


Figura 20 - Detecção dos genes microbianos *aoxA* e *aoxB* relacionados ao ciclo biogeoquímico de Arsênio nas salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro

Quanto aos genes microbianos relacionados à saída de Mercúrio e Selênio de ambientes aquáticos, foram encontradas 6 sequências correspondentes ao gene *merA* na salina Verde afiliadas ao gênero *Pseudomonas*, e na salina Preta 21 sequências afiliadas aos gêneros *Pseudomonas* e *Acidithiobacillus* (Figura 21). Não foram encontradas sequências correspondentes aos genes *serA* e *serB* relacionados ao ciclo biogeoquímico do Selênio.

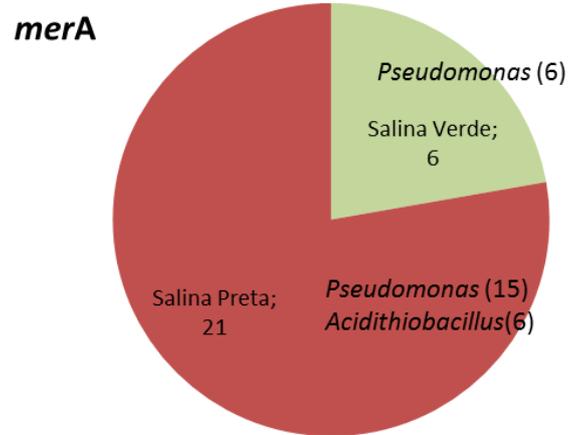


Figura 21 - Detecção do gene microbiano *merA* relacionado ao ciclo biogeoquímico do Mercúrio nas salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro

5.9 Dinâmica do Nitrogênio nas salinas do Pantanal

5.9.1 Abundância da comunidade diazotrófica nas salinas Verde e Preta

A quantificação do gene *nifH* por qPCR mostrou uma maior abundância de bactérias diazotróficas totais na Salina Verde em relação à Salina Preta, média de 10^6 e 10^5 cópias de *nifH* mL⁻¹, respectivamente. Na salina Verde não houve diferença na abundância das bactérias diazotróficas durante o dia na superfície e fundo da lagoas, entretanto observou-se que na salina Preta a maior abundância das bactérias diazotróficas totais encontrou-se no fundo da lagoa (Figura 22).

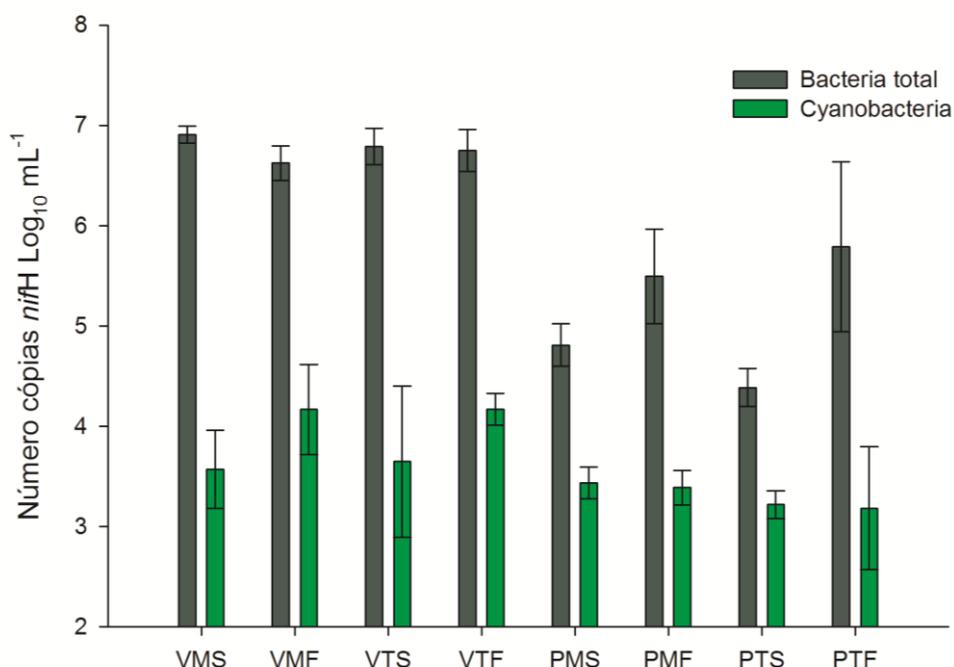


Figura 22 - Abundância da comunidade bacteriana total e cianobacteriana diazotrófica das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro. As barras de erro indicam o desvio padrão de abundâncias relativas entre as três repetições

Na Salina Verde, onde o filo Cyanobacteria é dominante, também observou-se uma maior abundância de diazotróficos no fundo da lagoa. Entretanto, na Salina Preta, onde a ocorrência de cianobactérias foi menor, a distribuição das cianobactérias diazotróficas foi homogênea ao longo de toda a coluna d'água.

5.9.2 Busca de genes microbianos envolvidos no ciclo biogeoquímico do nitrogênio

Foram realizadas buscas de genes envolvidos no ciclo biogeoquímico do nitrogênio nas sequências obtidas pelo sequenciamento metagenômico das salinas Verde e Preta, para verificar o envolvimento microbiano na dinâmica deste elemento nos ambientes estudados. Com exceção do gene *amoA*, foram encontrados todos os genes participantes dos processos de transformação do nitrogênio em ambas as salinas, porém em quantidades diferentes nos dois ambientes (Figura 23). Na salina Verde não foram encontradas sequências correspondentes ao gene *amoA* de arqueias e bactérias, e a maior proporção dos genes encontrados então relacionados à fixação biológica de nitrogênio. Na salina Preta foram encontradas apenas 2 sequências de *amoA* de arqueias e observou-se uma maior ocorrência de genes relacionados aos processos de mineralização e desnitrificação que na salina Verde.

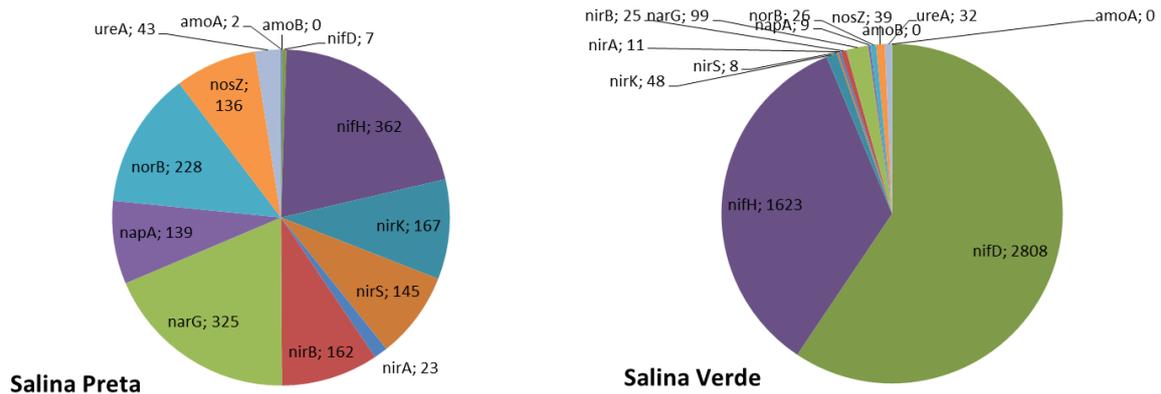


Figura 23 - Detecção dos genes relacionados ao ciclo biogeoquímico do nitrogênio encontrados nas bibliotecas metagenômicas das salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro

A identificação taxonômica das sequências obtidas foi realizada pela comparação com as sequências referência (Tabela 4).

Tabela 4 - Identificação taxonômica das sequências dos genes relacionados aos processos de transformação do nitrogênio nas Salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro

(continua)

ureA			
Salina Verde		Salina Preta	
Organismo	Frequência	Organismo	Frequência
<i>Deinococcus</i>	25%	<i>Anaeromyxobacter</i>	14%
<i>Kitasatospora</i>	22%	<i>Deinococcus</i>	12%
<i>Methylobacterium</i>	53%	<i>Kitasatospora</i>	16%
		<i>Methylobacterium</i>	19%
		<i>Myxococcus</i>	9%
		<i>Phycisphaera</i>	9%
		<i>Streptomyces</i>	21%
nifD			
<i>Allochromatium</i>	<0,1%	<i>Pseudomonas</i>	14%
<i>Anabaena</i>	11%		
<i>Calothrix</i>	2%		
<i>Chroococcidiopsis</i>	0,2%		
<i>Cylindrospermum</i>	5%		
<i>Fischerella</i>	0,8%		
<i>Leptothrix</i>	0,2%		
<i>Nodularia</i>	74%		
<i>Nostoc</i>	10%		
<i>Pseudomonas</i>	<0,1%		
<i>Thiocapsa</i>	<0,1%		
<i>Thiocystis</i>	<0,1%		

Tabela 4 - Identificação taxonômica das sequências dos genes relacionados aos processos de transformação do nitrogênio nas Salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro

(continuação)

<i>Thiorhodococcus</i>	0,2%		
<i>Tolypothrix</i>	2%		
nifH			
Salina Verde		Salina Preta	
Organismo	Frequência	Organismo	Frequência
<i>Anabaena</i>	57%	<i>Allochromatium</i>	<1%
<i>Bradyrhizobium</i>	<1%	<i>Bradyrhizobium</i>	13%
<i>Brevundimonas</i>	<1%	<i>Brevundimonas</i>	2%
<i>Cyanothece</i>	8%	<i>Fulvimarina</i>	2%
<i>Fischerella</i>	7%	<i>Gordonia</i>	6%
<i>Fulvimarina</i>	<0,1%	<i>Halorhodospira</i>	1%
<i>Ginkgo</i>	<1%	<i>Hoeflea</i>	3%
<i>Gordonia</i>	<1%	<i>Kytococcus</i>	2%
<i>Heterocapsa</i>	<0,2%	<i>Methylobacterium</i>	8%
<i>Hoeflea</i>	<0,1%	<i>Methylocella</i>	4%
<i>Lyngbya</i>	1%	<i>Methyloversatilis</i>	3%
<i>Methylobacterium</i>	2%	<i>Micromonospora</i>	2%
<i>Nostoc</i>	17%	<i>Mobilicoccus</i>	2%
<i>Rhodobacter</i>	<1%	<i>Nocardia</i>	1%
<i>Rhodomicrobium</i>	<0,1	<i>Nocardioideaceae</i>	2%
<i>Rhodopseudomonas</i>	1%	<i>Rhodobacter</i>	2%
<i>Rhodospirillum</i>	<1%	<i>Rhodomicrobium</i>	<1%
<i>Roseovarius</i>	<0,1	<i>Rhodopseudomonas</i>	14%
<i>Rubrivivax</i>	2%	<i>Rhodospirillum</i>	1%
<i>Synechocystis</i>	>1%	<i>Roseovarius</i>	<1%
<i>Thiocapsa</i>	>1%	<i>Rubrivivax</i>	14%
<i>Thiocystis</i>	<0,1	<i>Salinispora</i>	2%
		<i>Stackebrandtia</i>	2%
		<i>Synechococcus</i>	1%
		<i>Thiocapsa</i>	1%
		<i>Thermomonospora</i>	1%
		<i>Thiorhodococcus</i>	2%
amoA			
arqueias não cultivadas	100%	não houve	-
narG			
<i>Enterobacter</i>	49%	<i>Alishewanella</i>	2%
<i>Escherichia</i>	15%	<i>Enterobacter</i>	40%
<i>Gamma-proteobacterium</i>	5%	<i>Escherichia</i>	14%
<i>Klebsiella</i>	21%	<i>Gamma-proteobacterium</i>	7%
<i>Salmonella</i>	10%	<i>Klebsiella</i>	25%
		<i>Rheinheimera</i>	3%

Tabela 4 - Identificação taxonômica das sequências dos genes relacionados aos processos de transformação do nitrogênio nas Salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro

(continuação)			
		<i>Salmonella</i>	9%
napa			
Salina Verde		Salina Preta	
Organismo	Frequência	Organismo	Frequência
<i>Azospirillum</i>	20%	<i>Achromobacter</i>	7%
<i>Cupriavidus</i>	35%	<i>Azospirillum</i>	5%
<i>Pseudomonas</i>	45%	<i>Bordetella</i>	9%
		<i>Bradyrhizobium</i>	15%
		<i>Cupriavidus</i>	11%
		<i>Pseudomonas</i>	10%
		<i>Ralstonia</i>	20%
		<i>Rhodobacter</i>	9%
		<i>Rhodopseudomonas</i>	4%
		<i>Sinorhizobium</i>	4%
		<i>Starkeya</i>	6%
nirA			
<i>Cyanothece</i>	45%	<i>Mycobacterium</i>	30%
<i>Oscillatoria</i>	55%	<i>Pseudonocardia</i>	35%
		<i>Streptomyces</i>	35%
nirB			
<i>Burkholderia</i>	24%	<i>Acidovorax</i>	6%
<i>Delftia</i>	12%	<i>Azoarcus</i>	3%
<i>Pseudomonas</i>	64%	<i>Burkholderia</i>	29%
		<i>Cupriavidus</i>	13%
		<i>Delftia</i>	8%
		<i>Erwinia</i>	3%
		<i>Hydrocarboniphaga</i>	6%
		<i>Leptothrix</i>	4%
		<i>Ralstonia</i>	11%
		<i>Sorangium</i>	4%
		Bactérias não cultivadas	7%
		<i>Variovorax</i>	5%
nirK			
<i>Maricaulis</i>	12%	<i>Burkholderia</i>	3%
<i>Thiomonas</i>	46%	<i>Maricaulis</i>	4%
não identificado	41%	<i>Nitrosopumilus</i>	2%
		<i>Rhodanobacter</i>	7%
		<i>Rhodopseudomonas</i>	4%
		<i>Sphaerobacter</i>	3%
		<i>Thiomonas</i>	35%
		Bactérias não cultivadas	40%
nirS			
<i>Oceanithermus</i>	25%	<i>Acidovorax</i>	2%

Tabela 4 - Identificação taxonômica das sequências dos genes relacionados aos processos de transformação do nitrogênio nas Salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro

(continuação)			
<i>Pseudogulbenkiania</i>	12%	<i>Aromatoleum</i>	7%
<i>Pseudomonas</i>	63%	<i>Bordetella</i>	2%
		<i>Candidatus_Accumulibacter</i>	3%
		<i>Cupriavidus</i>	7%
		<i>Dechloromonas</i>	4%
		<i>Dechlorosoma</i>	5%
		<i>Hahella</i>	2%
		<i>Pseudomonas</i>	8%
		<i>Leptothrix</i>	2%
		<i>Magnetospirillum</i>	1%
		<i>Pseudogulbenkiania</i>	6%
		<i>Ralstonia</i>	7%
		<i>Rhodobacter</i>	<1%
		<i>Rubrivivax</i>	6%
		<i>Sideroxydans</i>	1%
		<i>Thauera</i>	5%
		<i>Thiobacillus</i>	3%
		Bactérias não cultivadas	29%

norB

Salina Verde		Salina Preta	
Organismo	Frequência	Organismo	Frequência
<i>Anaeromyxobacter</i>	27%	<i>Acidovorax</i>	10%
<i>Rhodospirillum</i>	27%	<i>Allochromatium</i>	3%
<i>Sorangium</i>	46%	<i>Anaeromyxobacter</i>	27%
		<i>Brachybacterium</i>	3%
		<i>Candidatus_Accumulibacter</i>	2%
		<i>Candidatus_Solibacter</i>	2%
		<i>Chromobacterium</i>	5%
		<i>Cupriavidus</i>	3%
		<i>Halopiger</i>	4%
		<i>Haloterrigena</i>	6%
		<i>Mobilicoccus</i>	3%
		<i>Mycobacterium</i>	9%
		<i>Propionibacterium</i>	<1%
		<i>Pseudoxanthomonas</i>	3%
		<i>Oceanimonas</i>	2%
		<i>Ralstonia</i>	4%
		<i>Rhodanobacter</i>	4%
		<i>Sorangium</i>	16%

nosZ

<i>Caldilinea</i>	5%	<i>Acidovorax</i>	3%
-------------------	----	-------------------	----

Tabela 4 - Identificação taxonômica das sequências dos genes relacionados aos processos de transformação do nitrogênio nas Salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro

		(conclusão)	
<i>Citreicella</i>	21%	<i>Achromobacter</i>	4%
<i>Dinoroseobacter</i>	10%	<i>Alicyclophilus</i>	<1%
<i>Flavobacterium</i>	15%	<i>Anaeromyxobacter</i>	10%
<i>Haliscomenobacter</i>	10%	<i>Azospirillum</i>	4%
<i>Niastella</i>	8%	<i>Belliella</i>	5%
<i>Runella</i>	10%	<i>Candidatus_Accumulibacter</i>	3%
<i>Sphaerobacter</i>	13%	<i>Dechlorosoma</i>	4%
<i>Thiocapsa</i>	8%	<i>Dyadobacter</i>	3%
		<i>Flavobacteriaceae</i>	4%
		<i>Flavobacterium</i>	6%
		<i>Gamma-proteobacterium</i>	1%
		<i>Gemmatimonas</i>	13%
		<i>Haliscomenobacter</i>	4%
		<i>Leptothrix</i>	4%
		<i>Niabella</i>	4%
		<i>Niastella</i>	3%
		<i>Pedobacter</i>	4%
		<i>Ralstonia</i>	4%
		<i>Rhodanobacter</i>	4%
		<i>Rhodobacter</i>	2%
		<i>Rhodothermus</i>	2%
		<i>Rubrivivax</i>	5%
		<i>Solitalea</i>	2%
		<i>Sphaerobacter</i>	4%

6 DISCUSSÃO

6.1 Diversidade microbiana nas salinas do Pantanal com e sem floração

O Pantanal brasileiro possui uma grande biodiversidade (JUNK et al., 2005), mas estudos relacionados à diversidade microbiana nesse bioma ainda são escassos. Os poucos trabalhos relacionados à diversidade microbiana nas salinas do Pantanal baseiam-se em levantamentos florísticos (SANTOS; SANT'ANNA, 2010; MALONE et al., 2007), ou em estudos filogenéticos de grupos específicos, como as cianobactérias (ANDREOTE et al., 2014; VAZ et al., 2015). Contudo, inexistem publicações acerca da diversidade e estrutura de comunidades microbianas nas salinas, sendo este trabalho o primeiro estudo aplicando técnicas robustas independentes de cultivo para sua caracterização.

O gênero cianobacteriano *Anabaenopsis* sp. foi identificado como dominante na floração observada na salina Verde. Esse não é o primeiro relato do gênero *Anabaenopsis* em salinas do Pantanal brasileiro. Santos e Sant'Anna (2010) encontraram a espécie *Anabaenopsis elenkinii* como o organismo dominante em florações observadas na salina do Meio, também localizada na região Nhecolândia do Pantanal brasileiro. Ainda no Pantanal da Nhecolândia, um levantamento dos gêneros de algas e cianobactérias do plâncton de duas salinas da Fazenda Nhumirim demonstrou a ampla ocorrência de cianobactérias nessas lagoas (MALONE et al., 2007). Os lagos de soda de Vale do Rift no continente Africano apresentam florações dominadas por *Arthrospira* spp. No lago Nakuru, localizado na África tropical, que também apresenta como principal íon o carbonato de sódio e pH de 10, uma densa população de *Anabaenopsis magna* e *Spirulina fusiformis* são encontrados (BALLOT et al., 2004).

Na salina Verde também foram encontradas sequências relacionadas aos filos Proteobacteria, Verrucomicrobia, Firmicutes, Bacteroidetes, Thermi, Acidobacteria e Planctomycetes. Todos esses filos foram encontrados relacionados à floração de cianobactérias em lagos de água doce na Suécia (EILER; BERTILSSON, 2004). Baumgarte (2003) estudou a comunidade microbiana do lago de soda denominado Magadi, Quênia, e encontrou o gênero de cianobactéria *Eubhalothece* como o organismo dominante, e associado à predominância de cianobactéria, também foram encontrados organismos pertencentes aos filos Firmicutes, Proteobacteria e Bacteroidetes.

Almeida e colaboradores (2011) sugerem que a prevalência de cianobactérias em salinas do Pantanal esteja relacionada à ausência de competidores, pois a alta salinidade e pH são fatores adversos para várias outras espécies fitoplanctônicas; à resistência desses

organismos à alta salinidade, altas temperaturas; ausência de predação pelo zooplâncton, pois essas lagoas não apresentam organismos macro invertebrados ou peixes habitando-as; e sua capacidade de controlar sua flutuabilidade e, assim, migrar através da coluna de água para aumentar a sua atividade fotossintética e contornar as variações de temperatura.

A relação entre a comunidade bacteriana e os atributos físico-químicos mostrou que a alcalinidade e o pH são os fatores com maior influência na composição da comunidade bacteriana, e ainda, diretamente proporcional à comunidade presente na salina Verde, dominada por cianobactérias e que também apresenta os filos Thermi e Spirochaetes em maior proporção que a Salina Preta. Interessante notar que esses mesmos atributos se apresentam inversamente proporcionais aos filos predominantes na Salina Preta. A maioria das cianobactérias habitam ambientes alcalinos (BADGER et al., 2006), sendo consideradas os micro-organismos mais alcalófilos (PIKUTA; HOOVER, 2007). A floração de cianobactérias é geralmente entendida como um aumento significativo na biomassa, ou seja, há um desequilíbrio entre o crescimento do fitoplâncton e os processos de perda (CARSTENSEN et al., 2007), sendo que a alta alcalinidade e elevado pH na salina Verde podem estar relacionados com o fenômeno da floração, devido à habilidade de sobrevivência das cianobactérias nessas condições.

Na Salina Preta, em que não há registros da ocorrência de florações, observou-se comunidade bacteriana mais diversa e estruturada, sem a dominância de algum grupo específico e com variações ao longo do dia. Os filos predominantes nesse ambiente foram Proteobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria e Verrucomicrobia, sendo apenas uma pequena quantidade de sequências afiliadas ao filo Cyanobactéria. Nesta salina, observou-se uma separação clara entre alguns organismos do fundo e da superfície da lagoa, onde predominaram os filos Chlamydiae e Proteobacteria e os filos Actinobacteria e Verrucomicrobia, respectivamente. Os maiores valores de abundância, riqueza e diversidade foram encontrados no fundo da salina. Humayoun e colaboradores (2003) encontraram uma diversidade microbiana maior no fundo do que na superfície lago de soda Mono Lake, Califórnia, EUA. Nesse estudo, a relação entre as variáveis físico-químicas e a composição da comunidade bacteriana na salina Preta mostra a temperatura como responsável pelas diferenças nos organismos do fundo e superfície da lagoa.

Apesar das diferenças nas composições das comunidades bacterianas, as águas das salinas do Pantanal pertencem à mesma família química (BARBIÉRO et al., 2002; FURQUIM et al., 2010), sendo que as diferentes características encontradas dependem do funcionamento hidrológico e de evapotranspiração em cada lagoa (SAKAMOTO, 1997).

O perfil taxonômico da comunidade microbiana foi também acessado pela técnica de sequenciamento metagenômico (*shotgun*). Em relação à composição da comunidade bacteriana, os resultados encontrados foram coerentes com os obtidos no pirosequenciamento do gene 16S RNAr, porém alguns dos grupos bacterianos apresentaram frequências relativas um pouco diferentes. Ainda, com relação à afiliação taxonômica das sequências geradas, foi possível acessarmos com essa abordagem, filos pertencentes ao domínio Eukarya, em particular sequências de microalgas pertencentes ao filo Chlorophyta. Malone e colaboradores (2007) encontraram nas florações de salinas do Pantanal da Nhecolândia alguns grupos de microalgas, e assim como nas salinas avaliadas pelo autor, (salina da Ponta e da Reserva), na salina Verde, foram encontradas sequências afiliadas à microalga do gênero *Scenedesmus*. Na salina Preta, mesmo não ocorrendo florações, esse gênero também foi encontrado.

Nesse trabalho, tanto o pirosequenciamento do gene 16S RNAr quanto o sequenciamento metagenômico representaram a diversidade microbiana, contudo, as duas abordagens tiveram suas vantagens e limitações: o sequenciamento do gene 16S RNAr acessou uma ampla gama de grupos bacterianos e até arqueias, porém apresenta o viés da amplificação desigual dos grupos. Por sua vez, o sequenciamento metagenômico permitiu a identificação de organismos do domínio *Eukarya*, mas pode não ter sido robusto o suficiente para avaliação da diversidade filogenética. Além disso, limitações no banco de dados, como o M5NR utilizado para afiliações taxonômicas do metagenoma e o uso de anotações automatizadas, podem não ser eficazes na identificação de alguns táxons (BOISSY et al., 2014; HONG et al., 2009; NEHME et al., 2008).

6.2 Metabolismo microbiano nas salinas

A ligação entre a diversidade dos micro-organismos que habitam ambientes salino-alcalinos, como os lagos de soda, com seus papéis eco-fisiológicos na ciclagem dos principais elementos desses ambientes, ainda é pouco compreendida (ANTONY et al., 2013). Especialmente em relação às salinas do Pantanal, apesar de suas composições químicas já terem sido elucidadas (ALMEIDA et al., 2011; BARBIÉRO et al., 2008; FURQUIM et al., 2008; MEDINA-JÚNIOR; RIETZELER, 2005; BARBIÉRO et al., 2002), inexistem publicações a respeito dos metabolismos ali presentes e a relação entre a microbiota e essa composição química, sendo este o primeiro relato acerca do perfil metabólico observado nas salinas do Pantanal.

Os mesmos grupos funcionais observados no sequenciamento metagenômico foram encontrados em ambas as salinas, Verde e Preta, mesmo estas possuindo perfis taxonômicos distintos. Este resultado de similaridade no perfil funcional é amplamente definido como a capacidade de diferentes comunidades microbianas executarem um processo funcional a uma taxa semelhante, independentemente das diferenças de composição taxonômica (KEISER et al., 2011). O resultado encontrado nas salinas do Pantanal está de acordo com modelos de ecossistemas atuais abordados em estudos ecológicos, que assumem que a composição microbiana pode mudar em resposta às novas condições ambientais, mas que contêm uma elevada taxa de redundância funcional tal que os processos metabólicos do ecossistema não são alterados (ALLISON; MARTINY, 2008). A ocorrência do número elevado dos diferentes grupos funcionais encontrados nas salinas ilustra que esses ambientes possuem uma complexa comunidade microbiana interligada a diversos ciclos biogeoquímicos. Alguns metabolismos encontrados nas salinas do Pantanal, como metabolismo do nitrogênio, do enxofre e fotossintético, já foram descritos na comunidade microbiana de lagos de soda distribuídos nos continentes da África, América do norte e Eurásia (ANTONY et al., 2013).

Apesar das similaridades, as salinas Verde e Preta apresentaram algumas diferenças significativas na frequência de alguns metabolismos encontrados. Na salina Verde, os metabolismos relacionados à fotossíntese, à resposta a estresse, à síntese de RNA, proteínas e carboidratos, apresentaram uma frequência significativamente maior que na salina Preta. O elevado metabolismo de fotossíntese na salina Verde já era esperado, devido à floração. Perfil metabólico similar já foi encontrado durante a floração de *Microcystis aeruginosa* no reservatório de Kranji, onde, além desses, foram encontrados transcritos relacionados aos metabolismos de reparo de DNA, síntese de microviridina, desenvolvimento de vesículas gasosas e processamento de informações genéticas (PENN et al., 2014).

6.2.1 Metabolismo de arsênio, mercúrio e selênio nas salinas

Alguns processos de transformação de arsênio (As) já foram reportados em lagos de soda. No metabolismo bacteriano, este elemento desempenha um papel importante, pois serve tanto como receptor de elétrons na oxidação da matéria orgânica, quanto como doador de elétrons (HOLLIBAUGH et al., 2005; MAEST et al., 1992). Nas salinas do Pantanal, o acúmulo de As foi descrito por Barbiéro e colaboradores (2007), onde demonstraram que as concentrações de As nas águas dessas lagoas variavam de 0,11 mg/L a 3,68 mg/L, até 368 vezes maior do que apontado nas diretrizes da Organização Mundial de Saúde como limite para que a água seja considerada potável, de 0,01 mg/L. A mobilização de arsênio em

condições oxidantes é conhecida como responsável por problemas de acumulação desse elemento em muitas águas (TAKAMATSU et al., 1985). Diversos grupos bacterianos podem utilizá-lo em seu metabolismo (CAI et al., 2009). Nas salinas Verde e Preta foram encontradas sequências do gene *aoxAB* que codificam a enzima arsenito oxidase envolvida na oxidação do arsênio, afiliadas aos gêneros *Thiomonas*, *Sinorhizobium* e *Agrobacterium*, todas pertencentes ao filo Proteobacteria. Bactérias oxidantes de arsenito foram descobertas em 1918 (GREEN, 1918), e atualmente se conhece mais de 30 linhagens que representam, pelo menos, nove gêneros oxidantes de arsenito, incluindo organismos pertencentes aos filios Proteobacteria e Thermus (STOLZ et al., 2006). Organismos dos gêneros *Agrobacterium* e *Thiomonas* são frequentemente encontrados em ambientes contaminados por arsênio e são descritos por apresentarem capacidades fisiológicas e metabólicas interessantes, em particular a capacidade de oxidação de As (III) (ARSÈNE-PLOETZE et al., 2010; CAI et al., 2009), forma encontrada por Barbiéro e colaboradores (2007) nas salinas do Pantanal. Apesar de serem conhecidas pela capacidade de fixação biológica de nitrogênio, organismos do gênero *Sinorhizobium* já foram também encontrados em águas subterrâneas ricas em arsênio em Taiwan e descritos como capazes de oxidar arsenito (LIAO et al., 2011).

O mercúrio, por sua vez, quando avaliado em lagos de soda da África juntamente com outros metais, foi o que apresentou as menores concentrações (CALAMARI; NAEVE, 1994), entretanto no lago de soda Great Lake, EUA, esse elemento é responsável por grande contaminação das águas (GLASS et al., 1990). Nas salinas do Pantanal, assim como nos lagos de soda da África, esse elemento também é encontrado em baixas concentrações (BARBIÉRO, 2011). Neste trabalho, foram encontradas sequências do gene *merA*, codifica a enzima mercúrio redutase, capaz de reduzir o mercúrio II para a forma volátil, e pode estar relacionada à perda deste elemento nas salinas do Pantanal. A enzima mercúrio redutase já foi descrita em várias linhagens dos gêneros *Acidithiobacillus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Thiobacillus* (BROWN et al., 2003). Nas salinas estudadas as sequências do gene *merA* encontradas foram afiliadas aos gêneros *Acidithiobacillus* e *Pseudomonas*. O número reduzido de sequências relacionadas a esse gene sugere que a maior parte dessa redução pode não ser mediada por micro-organismos, e sim por processos físico-químicos, pois o potencial redox presente nas salinas Verde e Preta é favorável para essa transformação (MIRANDA et al., 2007).

Do mesmo modo que o mercúrio, o selênio também é encontrado em baixas concentrações nas salinas do Pantanal (BARBIÉRO, 2011). Algumas bactérias também possuem a capacidade de reduzir o selênio de ambientes aquáticos para sua forma elementar,

o que acarreta na redução do elemento nesses ambientes (SIDDIQUE et al., 2005). No lago de soda Tukh, Mongólia, Hamamura e colaboradores (2012), encontraram populações bacterianas capazes de reduzir selenatos a forma elementar de selênio. Nas salinas do Pantanal, os genes avaliados *serA* e *serB* não foram encontrados, indicando que a saída desse elemento independe de ação microbiana e pode estar relacionada a processos físico-químicos.

6.2.2 Metabolismo de nitrogênio nas salinas

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para todos os organismos e, como um componente essencial de proteínas, é fundamental para as estruturas e os processos bioquímicos que definem a vida (CAPONE et al., 2006). O N existe em vários estados de oxidação e formas químicas, sendo que os micro-organismos podem atuar nos processos de transformação deste elemento no ambiente (FRANCIS et al., 2007). Embora os processos de transformação do N e o papel de diversos micro-organismos sejam definidos, em muitos ambientes ainda não se compreende toda a dinâmica de transformação desse elemento. Este é o primeiro estudo buscando genes microbianos envolvidos nos processos de transformação do N em salinas do Pantanal brasileiro. Os genes microbianos envolvidos neste ciclo buscados nesse trabalho, bem como os processos em que estão envolvidos, são representados esquematicamente na Figura 24.

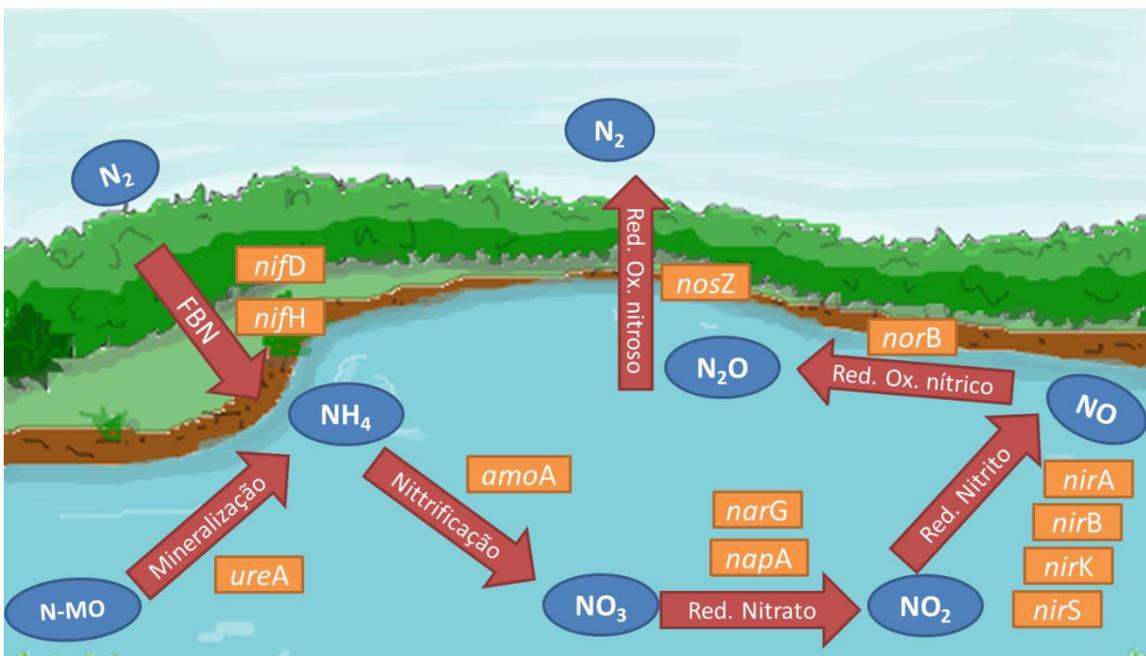


Figura 24 - Esquema das transformações do nitrogênio e respectivos genes microbianos envolvidos buscados na biblioteca metagenômica

A entrada do N nas salinas do Pantanal pode se dar de algumas formas: decomposição da matéria orgânica (mediada por micro-organismos), abastecimento de água subterrânea (processos físico-químicos) e fixação biológica (mediada por micro-organismos) (MEDINA-JÚNIOR; RIETZLER, 2005). No processo de mineralização do nitrogênio, decorrente da decomposição da matéria orgânica, observou-se nas duas salinas a presença do gene *ureA*, que codifica a enzima urease, afiliadas aos gêneros *Deinococcus*, *Kitasatospora* e *Methylobacterium*. Entretanto, na salina Preta observou-se sequências também identificadas como pertencentes os gêneros *Anaeromyxobacter*, *Myxococcus*, *Phycisphaera* e *Streptomyces*. O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) nas salinas foi avaliado pela busca dos genes *nifD* e *nifH*, que codificam subunidades da enzima dinitrogenase redutase, componente do complexo enzimático nitrogenase (STACEY et al., 1992). A fixação biológica de nitrogênio é um processo realizado apenas por micro-organismos procariotos, dentre os quais algumas espécies de cianobactérias (SHRIDHAR, 2012). É interessante ressaltar que o gênero *Anabaenopsis* sp., responsável pela floração na Salina Verde, tem capacidade de fixar nitrogênio. Entretanto, nessa salina, os genes *nif* encontrados foram afiliados a vários gêneros de cianobactérias. Também foram encontrados genes não cianobacterianos relacionados ao processo de FBN na salina Verde, o que coincide com os resultados de quantificação do gene *nifH* por qPCR, que demonstrou que outros grupos diazotróficos, além das cianobactérias, estão atuantes na fixação biológica do nitrogênio atmosférico nesse ambiente. Na salina Preta foram encontradas sequências do gene *nifD* afiliadas apenas ao gênero *Pseudomonas*. Já em relação ao gene *nifH*, as sequências afiliaram-se a diversos grupos de bactérias diazotróficas. Esses dados sugerem que outros grupos bacterianos, que não as cianobactérias, são os maiores responsáveis pelo processo nesse ambiente.

A nitrificação é o processo conhecido de oxidação de amônia para nitrito e nitrato. Sequências do gene *amoA* que codifica a enzima amônia oxigenase, só foram encontradas na salina Preta e afiliadas à sequências de arqueias não cultivadas. De acordo com Oren (2001), as bactérias nitrificantes tendem a estar ausentes de ambientes de alta salinidade. A bactéria cultivada mais halotolerante capaz de oxidar amônia, *Nitrosococcus halophilus*, não se mostrou capaz de realizar o processo de nitrificação no lago de soda Great Salt Lake, Utah (POST; STUBE, 1988). Em lagos de soda, a oxidação de amônia a nitrito por uma subpopulação de *Nitrosomonas halophila* extremamente tolerante à alcalinidade já foi relatada, enquanto a oxidação de nitrito a nitrato foi descrita em um grupo de *Nitrobacter alkalicus* moderadamente tolerante à alcalinidade (SOROKIN et al., 2014). Contudo, o ciclo do nitrogênio em lagos de soda, em particular nos hipersalinos, pode depender de uma fonte

de externa de suprimento de nitrato ou nitrito (OREN, 2001). Assim, os resultados obtidos demonstram que o processo de nitrificação nas salinas do Pantanal pode estar sendo realizados por organismos ainda desconhecidos ou que uma fonte externa de nitrato e nitrito pode estar abastecendo as lagoas.

A desnitrificação é o processo de redução anaeróbica de nitrato até a forma gasosa de nitrogênio (BARNARD; LEADLEY, 2005). Em relação aos processos de desnitrificação, em todas as etapas (redução do nitrato, redução do nitrito, redução do óxido nítrico e redução do óxido nitroso) a salina Preta apresentou a maior riqueza de espécies que possivelmente estejam realizando tais processos. Entretanto, na salina Verde, esses processos ficam restritos a poucos organismos e foram encontradas cianobactérias pertencentes aos gêneros *Cyanothece* e *Oscillatoria* apenas relacionadas ao gene *nirA* nessa lagoa. O processo de desnitrificação em lagos de soda foi descrito por Sorokin e colaboradores (2014), que identificaram os gêneros de bactérias *Halomonas*, *Thioalkalivibrio* e o grupo *Alkalilimnicola*–*Alkalispirillum* realizando esse processo. Contudo, nenhuma sequência correspondente a esses organismos foi encontrada na salina do Pantanal.

Os dados gerados pelo presente estudo indicam que todas as etapas de transformação do ciclo do nitrogênio podem estar ocorrendo nas salinas e que todos podem estar sendo mediados por micro-organismos. Em geral, observou-se que os mesmos processos ocorrem nas salinas Verde e Preta, porém os organismos que podem estar realizando tais funções são diferentes, o que mais uma vez demonstra uma alta redundância funcional nesses ambientes.

7 CONCLUSÕES

Este trabalho fornece a primeira avaliação robusta sobre a estrutura e composição das comunidades microbianas que habitam as salinas do Pantanal brasileiro. Os resultados obtidos sugerem que além das diferenças nos perfis físico-químicos e limnológicos, as salinas Verde e Preta diferem também quanto a diversidade e estrutura das comunidades bacterianas.

A floração de *Anabaenopsis* sp. encontrada na salina Verde sofre influência dos fatores ambientais alcalinidade e pH, e sua ocorrência determina uma comunidade taxonomicamente menos estratificada em comparação com a salina Preta.

O potencial metabólico dessas salinas apresenta alta similaridade e os táxons envolvidos possuem alta redundância funcional. Ainda, há uma participação efetiva dos micro-organismos nos ciclos biogeoquímicos do arsênio, mercúrio e nitrogênio nessas lagoas.

REFERÊNCIAS

- ABDON, M.M.; POTT, V.J.; SILVA, J.S.V. Avaliação da cobertura por plantas aquáticas em lagoas da sub-região da nhecolândia no pantanal por meio de dados landsatespot. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. especial, p. 1675-1681, 1998.
- ADÁMOLI, J. Vegetação do Pantanal. In: ALLEM, A.C.; VALLS, J.F.M. **Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-Grossense**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1987. p. 1-339.
- ALLISON, S.D.; MARTINY, J.B.H. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 105, p. 11512–11519, 2008.
- ALMEIDA, T.I.R.; CALIJURI, M.C.; FALCO, P.B.; CASALI, S.P.; KUPRIYANOVA, E.; PARANHOS FILHO, A.C.; SIGOLO, J.B.; BERTOLO, R.A. Biogeochemical process and the diversity of Nhecolândia lakes, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 2, p. 391-407, 2011.
- AMANN, R.I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 1, p. 143–169, 1995.
- ANDREOTE, A.P.D.; VAZ, M.G.M.V.; GENUÁRIO, D.B.; BARBIÉRO, L.; REZENDE-FILHO, A.T.; FIORE, M.F. Nonheterocytous cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 50, n. 4, p. 675-684, 2014.
- ANTONY, C.P.; KUMARESAN, D.; HUNGER, S.; DRAKE, H.L.; MURRELL, J.C.; SHOUCHE, Y.S. Microbiology of Lonar Lake and other soda lakes. **The ISME Journal - Mini Review**, London, v. 7, p. 468-476, 2013.
- ARSÈNE-PLOETZE, F.; KOEHLER, S.; MARCHAL, M.; COPPÉE, J.Y.; CHANDLER, M.; BONNEFOY, V.; BROCHIER-ARMANET, C.; BARAKAT, M.; BARBE, V.; BATTAGLIA-BRUNET, F.; BRUNEEL, O.; BRYAN, C.G.; CLEISS-ARNOLD, J.; BERTIN, P.N. Structure, function, and evolution of the *Thiomonas* spp. Genome. **Plos Genetics**, São Francisco, v. 6, n. 2, p. 1-13, 2010.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4th ed. Menlo Park: Addison Wesley Longman; The Benjamin/Cumming Publ., 1997. 694 p.
- AZIZ, R.K.; DEVOID, S.; DISZ, T.; EDWARDS, R.A.; HENRY, C.S.; OLSEN, G.J.; OLSON, R.; OVERBEEK, R.; PARELLO, B.; PUSCH, G.D.; STEVENS, R.L.; VONSTEIN, V.; XIA, F. Seed servers: high-performance access to the seed genomes, annotations, and metabolic models. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 7, n. 10, p. 1-10, 2012.
- BADGER, M.R.; PRICE, G.D.; LONG, B.M.; WOODGER, F.J. The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 249–265, 2006.

BALLOT, A.; KRIENITZ, L.; KOTUT, K.; WIEGAND, C.; METCALF, J.S.; CODD, G.A.; PFLUGMACHER, S. Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya – Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita. **Journal of Plankton Research**, New York, v. 26, n. 8, p. 925-935, 2004

BARBIÉRO, L. QUEIROZ NETO, J.P.; CIORNEI, G.; SAKAMOTO, A.Y.; CAPELLARI, B.; FERNANDES, E. Geochemistry of water and ground water in the Nhecolândia, Pantanal of Mato Grosso, Brazil: variability and associated processes. **Wetlands**, Wilmington, v. 22, p. 528-540, 2002.

BARBIÉRO, L.; FURQUÍM, S.C.; VALLES, V.; FURIAN, S.; SAKAMOTO, A.; FILHO, A.R.; FORT, M. Natural arsenic in groundwater and alkaline lakes at the upper Paraguay basin, Pantanal, Brazil. In: BHATTACHARYA, P.; MUKHERJEE, A. B.; BUNDSCHUH, J.; ZEVENHOVEN, R.; LOEPPERT, R. H. **Arsenic in soil and groundwater environment**, Amsterdam: Elsevier, v. 9, p. 101-126, 2007.

BARBIÉRO, L.; REZENDE FILHO, A.; FURQUIM, S.A.C.; FURIAN, S.; SAKAMOTO, A.Y.; VALLES, V.; GRAHAM, R.C.; FORT, M.; FERREIRA, R.P.D.; QUEIROZ NETO, J.P. Soil morphological control on saline and freshwater lake hydrogeochemistry in the Pantanal of Nhecolândia, Brazil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 148, p. 91-106, 2008.

BARBIÉRO, L. **Fonctionnement hydro-bio-géochimique de lacs en environnement alcalin extrême et contrasté (Plaine d'inondation du Pantanal, Brésil)**. Toulouse: Institut national des sciences de l'Univers, 2011. p. 1-15.

BARKAY, T.; MILLER, S.M.; SUMMERS, A.O. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 27, p. 355-384, 2003.

BARNARD, R.; LEADLEY, P.W. Global change, nitrification and denitrification: A review. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 19, p. 1-13, 2005.

BAUMGARTE, S. **Microbial diversity of soda lake habitats**. 2003. 187 p. Thesis (PhD in Natural Sciences) - Technischen Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig, 2003.

BAXTER, B.K.; LITCHFIELD, C.D.; SOWERS, K.; GRIFFITH, J.D.; ARORA DASSARMA, P.; DASSARMA, S. Microbial diversity of Great Salt Lake. In: GUNDE-CIMERMAN, N.; OREN, A.; PLEMENITA, A. (Ed.). **Adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria, and eukarya**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 9-25.

BAZZO, J.C.; FREITAS, D.A.F.; SILVA, M.L.N.; CARDOSO, E.L.; SANTOS, S.A. Aspectos geofísicos e ambientais do Pantanal da Nhecolândia. **Revista de Geografia (UFPE)**, Recife, v. 29, n. 1, p. 141-161, 2012.

BÉBIEN, M.; KIRSCH, J.; MÉJEAN, V.; VERMÉGLIO, A. Involvement of a putative molybdenum enzyme in the reduction of selenate by *Escherichia coli*. **Microbiology**, London, v. 148, p. 3865-3872, 2002.

BENLLOCH, S.; RODRIGUEZ-VALERA, F.; MARTINEZ-MURCIA, A.J. Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S rDNA PCR amplification and partial sequencing. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 18, p. 267-279, 1995.

- BENSON, D.A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; SAYERS, E.W. Genbank. **Nucleic Acids Research**, London, v. 41, p. 36-42, 2013.
- BLAZEWICZ, S.J.; BARNARD, R.L.; DALY, R.A.; FIRESTONE, M.K. Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: limitations and uses. **The ISME Journal**, London, v. 7, p. 2061-2068, 2013.
- BLUM, J.S.; BINDI, A.B., BUZELLI, J.; STOLTZ, J.F.; OREMLAND, R.S. *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 171, p. 19-30, 1998.
- BOISSY, R.J.; ROMBERGER, D.J.; ROUGHEAD, W.A.; WEISSENBURGER-MOSER, L.; POOLE, J.A.; LEVAN, T.D. Shotgun pyrosequencing metagenomic analyses of dusts from swine confinement and grain facilities. **Plos One**, São Francisco, v. 9, n.4, p. 1-10, 2014.
- BOKULICH, N.A.; JOSEPH, C.M.L.; ALLEN, G.; BENSON, A.K.; MILLS, D.A. Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine. **Plos One**, São Francisco, v. 7, n. 5, p. 336-357, 2012.
- BORDELEAU, L.M.; PREVOST, D. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 161, p. 115-125, 1994.
- BROCK, T.D.; FREEZE, H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp n., a nonsporulating extreme thermophile. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 98, n. 1, p. 289-297, 1969.
- BROW, N.L.; STOYANOV, J.V.; KIDD, S.P.; HOBMAN, J.L. The merR family of transcriptional regulators. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 27, p. 145-163, 2003.
- BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- CAI, L.; LIU, G.; RENSING, C.; WANG, G. Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. **BMC Microbiology**, London, v. 9, n. 4, p. 1-11, 2009.
- CALAMARI, D.; NAEVE, H. (Ed.). **Review of pollution in the African aquatic environment**. Rome: CIFA, 1994. 118 p. (FAO. Technical Paper, 25).
- CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM-Agri: sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v. 1, n. 2, p. 18-24, 2001.
- CAPONE, D.G. Perspective: ramping up the heat on nitrogenase. **Science**, Washington, v. 314, p. 1691-1692, 2006.

CAPORASO, J.G.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; DESANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; KNIGHT, R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, p. 266–267, 2010a.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI J.; STOMBAUGH J.; BITTINGER K.; BUSHMAN F.D.; COSTELLO E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, New York, v. 7, p. 335–336, 2010b.

CARSTENSEN, J.; HENRIKSEN, P.; HEISKANEN, A.S. Summer algal blooms in shallow estuaries: Definition, mechanisms, and link to eutrophication. **Limnology and Oceanography**, Grafton, v. 52, n. 1, p. 370-384, 2007.

CASAMAYOR, E.O.; TRIADÓ-MARGARIT, X.; CASTAÑEDA, C. Microbial biodiversity in saline shallow lakes of the Monegros Desert, Spain. **FEMS Microbial Ecology**, Amsterdam, v. 85, p. 503-518, 2013.

CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, Oxford, v. 11, p. 265-270, 1984.

CHAO, A.; LEE, S.M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of the American Statistical Association**, Boston, v. 87, n. 417, p. 210-217, 1992.

CHAO, A.; SHEN, T.J. Nonparametric estimation of Shannon's index of diversity when there are unseen species in sample. **Environmental and Ecological Statistics**, London, v. 10, p. 429-443, 2003.

CHEN, H.; LIU, J.; MERRICK, B.A.; WAALKES, M.P. Genetic events associated with arsenic-induced malignant transformation: applications of Cdna microarray technology. **Molecular carcinogenesis**, Austin, v. 30, p. 79-87, 2001.

CLARKE, A.C.; STANTON, J.A.L.; WHITE, W.T.J.; KAPLAN, M.E.; MATISOO-SMITH, E.A. The geographic consortium: from cheek swabs to consensus sequences: an A to Z protocol for high-throughput DNA sequencing of complete human mitochondrial genomes. **BMC Genomics**, London, v. 15, n. 68, p. 15-68, 2014.

COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARREL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 37, p. 141-145, 2008.

DASH, H.R.; Das, S. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial *mer* genes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 75, p. 207-213, 2012.

DASSARMA S.; ARORA P. **Encyclopedia of life sciences**. London: Nature Publishing Group, 2001. 18384 p.

DAUBIN, V.; MORAN, N.A.; OCHMAN, H. Phylogenetics and cohesion of bacterial genomes. **Science**, Washington, v. 301, p. 829-832, 2003.

DONG, H.; YU, B. Geomicrobiological process in extreme environments: a review. **Episodes**, Ottawa, v. 30, n. 3, p. 202-216, 2007.

DUCKWORTH, A.W.; GRANT, W.D.; JONES, B.E.; VAN STEENBERGEN, R. Phylogenetic diversity of soda lake alkaliphiles. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 19, p. 181-191, 1996.

EILER, A.; BERTILSSON, S. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. **Environmental Microbiology**, New York, v. 6, n. 12, p. 1228-1243, 2004.

FAKRUDDING, M.; CHOWDHURY, A. Pyrosequencing-an alternative to traditional sanger sequencing. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 8, n. 1, p. 14-20, 2012.

FAKRUDDING, M.; MANNAN, K.S.B. Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments, review paper. **Ceylon Journal of Science**, Peradeniya, v. 42, n. 1, p. 19-33, 2013.

FISH, J.A.; CHAI, B.; WANG, Q.; SUN, Y.; BROWN, C.T.; TIEDJE, J.M.; COLE, J.R. FunGene: the functional gene pipeline and repository. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, n. 291, p. 1-14, 2013.

FOTI, M.; SOROKIN, D.Y.; LOMANS, B.; MUSSMAN, M.; ZACHAROVA, E.E.; PIMENOV, N.V.; KUENEN, J.G.; MUYZER, G. Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline Soda Lakes. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, n. 7, p. 2093-2100, 2007.

FRANCIS, C.A.; BEMAN, J.M.; KUYPERS, M.M.M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. **The ISME Journal**, London, v. 1, p. 19-27, 2007.

FRONTIER, S. Diversity and structure in aquatic ecosystems. **Oceanography and Marine Biology**, Abingdon, v. 23, p. 253-312, 1985.

FURIAN, S.; MARTINS, E.C.R.; PARIZOTTO, T.M.; REZENDE-FILHO, A.T.; VICTORIA, R.L.; BARBIERO, L. Chemical diversity and spatial variability in myriad lakes in Nhecolândia in the Pantanal wetlands of Brazil. **Limnology and Oceanography**, Grafton, v. 58, p. 2249-2261, 2013

FURQUIM, S.A.C.; GRAHAM, R.C.; BARBIERO, L.; QUEIROZ NETO, J.P.; VALLÉS, V. Mineralogy and genesis of smectites in an alkaline-saline environment of Pantanal wetland, Brazil. **Clays and Clay Mineral**, Long Island City, v. 56, p. 580-596, 2008.

FURQUIM, S.A.C.; GRAHAM, R.C.; BARBIERO, L.; QUEIROZ NETO, J.P.; VIDAL-TORRADO, P. Soil mineral genesis and distribution in saline lake landscape of Pantanal wetland, Brazil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 154, p. 580-596, 2010.

GARCIA, E.A.C. **O clima no Pantanal mato-grossense**. Corumbá: EMBRAPA, 1984. 39 p. (Circular Técnica, 14).

GAREEB, A.P.; SETATI, M.E. Assessment of alkaliphilic haloarchaeal diversity in Sua pan evaporator ponds in Botswana. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, p. 259-267, 2009.

GLASS, G.E.; SORENSEN, J.A.; SCHMIDT, K.W.; RAPP JR., G.R. New source identification of mercury contamination in the Great Lakes. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 24, n. 7, p. 1059-1069, 1990.

GRANT, W.D. Alkaline environments and biodiversity. In: GERDSY, C.; GLANSDORFF, N. (Ed.). **Extremophiles: basic concepts**. Paris: Encyclopedia of Life Support Systems, 2003. p. 21-38.

GRANT, W.D.; JONES, B.E.; MWATHA, W.E. Alkaliphiles: ecology, diversity and applications. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 75, p. 255–270, 1990.

GREEN, H.H. Description of a bacterium which oxidizes arsenite to arsenate, and one of which reduces arsenate to arsenite, isolated from a cattle-dipping tank. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v. 14, p. 465–467, 1918.

HAAS, B.J.; GEVERS, D.; EARL, A.M.; FELDGARDEN, M.; WARD, D.V.; GIANNOUKOS, G.; CIULLA, D.; TABBA, D.; HIGHLANDER, S.K.; SODERGREN, E.; METHÉ, B.; DESANTIS, T.Z.; PETROSINO, J.F.; KNIGHT, R.; BIRREN, B.W. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. **Genome Research**, Woodbury, v. 21, p. 494–504, 2011.

HAMAMURA, N.; LIU, Y.; INSKEEP, W.P. Identification of bacterial community and arsenate-reducing bacteria associated with a soda lake in Khovsgol, Mongolia. In: KAWAGUCHI, M.; MISAKI, K.; SATO, H.; TOKOKAWA, T.; ITAI, T.; NGUYEN, T.M.; ONO, J.; TANABE, S. (Ed.). **Interdisciplinary studies on environmental chemistry**. Aveiro: Terrapub, 2012. p. 99-107.

HENRIQUES, I.S.; ALVES, A.; TACAO, M.; ALMEIDA, A.; CUNHA, A.; CORREIA, A. Seasonal and spatial variability of free-living bacterial community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal). **Estuarine Coastal and Shelf Science**, London, v. 68, p. 139–148, 2006.

HOLLIBAUGH, J.T.; CARINI, S.; GÜRLEYÜK, H.; JELLISON, R.; JOYE, S.B.; LECLEIR, G.; MEILE, C.; VASQUEZ, L.; WALLSCHLÄGER, D. Distribution of arsenic species in alkaline, hypersaline, Mono Lake, California and response to seasonal stratification and anoxia. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Canberra, v. 69, p. 1925–1937, 2005.

HONG, S.; BUNGE, J.; LESLIN, C.; JEON, S.; EPSTEIN, S.S. Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. **The ISME Journal**, London, v. 3, p. 1365–1373, 2009.

- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 180, p. 4765–4774, 1998.
- HUMAYOUN, S.B.; BANO, N.; HOLLIBAUGH, J.T. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 1030–1042, 2003.
- JIANG, H.; DONG, H.; YU, B.; LI, Y.; JI, S.; LIU, X.; ZHANG, C. Microbial response to salinity change in Lake Chaka, a hypersaline lake on Tibetan Plateau. **Environmental Microbiology**, New York, v. 9, p. 2603–2621, 2007.
- JONES, B.E.; GRANT, W.D.; DUCKWORTH, A.W.; OWENSON, G.G. Microbial diversity of soda lakes. **Extremophiles Review**, Amsterdam, v. 2, p. 191–200, 1998.
- JUNK, W.J.; CUNHA, C.N.; WANTZEN, K.M.; PETERMANN, P.; STRÜSSMANN, C.; MARQUES, M.I.; ADIS, J. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. **Aquatic Sciences**, Amsterdam, v. 68, p. 278–309, 2006.
- KANEHISA, M. A database for post-genome analysis. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 13, n. 9, p. 375–376, 1997.
- KEISER, A.D.; STRICKLAND, M.S.; FIERER, N.; BRADFORD, M.A. The effect of resource history on the functioning of soil microbial communities is maintained across time. **Biogeosciences**, Katlenberg-Lindau, v. 8, p. 1477–1486, 2011.
- KELLER, M.; ZENGLER, K. Tapping into microbial diversity. **Nature Reviews: Microbiology**, New York, v. 2, p. 141–151, 2004.
- KERKAR, S. Ecology of hypersaline microorganisms. In: RAMAIAH, N. (Ed.). **Marine microbiology: facets & opportunities**. Goa: National Institute of Oceanography, 2004. p. 37–47.
- KRULWICH, T.A.; ITO, M.; HICKS, D.B.; GILMOUR, R.; GUFFANTI, A.A. pH homeostasis and ATP synthesis: studies of two processes that necessitate inward proton translocation in extremely alkaliphilic *Bacillus* species. **Extremophiles**, Amsterdam, v. 2, p. 217–222, 1998.
- KUNTE, H.J. Osmoregulation in halophilic bacteria. **Extremophiles**, Amsterdam, v. 2, p. 263–277, 2012.
- LIAO, V.H.C.; CHU, Y.J.; SU, Y.C.; HSIAO, S.Y.; WEI, C.C.; LIU, C.W.; LIAO, C.M.; SHEN, W.C.; CHANG, F.J. Arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with arsenic-rich groundwater in Taiwan. **Journal of Contaminant Hydrology**, Amsterdam, v. 123, p. 20–29, 2011.
- MAEST, A.S.; PASILIS, S.P.; MILLER, L.G.; NORDSTROM, D.K. Redox geochemistry of arsenic and iron in Mono Lake, California. In: KHARAKA, Y.K.; MAEST, A.S. (Ed.). **Water-rock interaction**. Rotterdam: August Aimé Balkema Publ., 1992. p. 507–511.

MALONE, C.F.S.; SANTOS, K.R.S.; JOSÉ NETO, M.; SAKAMOTO, A.Y. Gêneros de algas no plâncton de lagoas salinas situadas na fazenda Nhumirim, Pantanal da Nhecolândia, MS. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 588-590, 2007.

MARIOT, M.; DUDAL, Y.; FURIAN, S.; SAKAMOTO, A.; VALLÈS, V.; FORT, M.; BARBIERO, L. Dissolved organic matter fluorescence as a water-flow tracer in the tropical wetland of Pantanal of Nhecolândia, Brasil. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 388, p. 184-193, 2007.

MATURRANO, L.; SANTOS, F.; ROSSELLO-MORA, R.; ANTON, J. Microbial diversity in Maras Salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 72, p. 3887-3895, 2006.

MEDINA-JÚNIOR, P.B.; RIETZLER, A.C. Limnological study of a Pantanal saline lake. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 65, n. 4, p. 651-659, 2005.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; SOUZA, M.D.; OLSON, R.; GLASS, E.M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R.A. The metagenomics RAST server: a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of genomes. **BMC Bioinformatics**, London, v. 9, n. 386, p. 1-8, 2008.

MIRANDA, M.R.; COELHO-SOUZA, S.A.; GUIMARÃES, J.R.D.; CORREIA, R.R.S.; OLIVEIRA, D. Mercúrio em sistemas aquáticos: fatores ambientais que afetam a metilação. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 240-251, 2007.

MOURÃO, G.M. **Limnologia comparativa de três lagoas (duas “Baías” e uma “Salina”) do Pantanal da Nhecolândia, MS**. 1989. 135 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1989.

MOURÃO, G.M.; ISHII, I.H.; CAMPOS, Z.M.S. Alguns fatores limnológicos relacionados com a ictiofauna de baías e salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. **Acta Limnologica Brasiliensis**, São Carlos, v. 2, p. 181-198, 1988.

MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

NEHME, B.; LETOURNEAU, V.; FORSTER, R.J.; VEILLETTE, M.; DUCHAINE, C. Culture-independent approach of the bacterial bioaerosol diversity in the standard swine confinement buildings, and assessment of the seasonal effect. **Environmental Microbiology**, New York, v. 10, p. 665-675, 2008.

NEVIN, K.P.; FINNERAN, K.T.; LOVLEY, D.R. Microorganisms associated with uranium bioremediation in a high-salinity subsurface sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, n. 6, p. 3672-3675, 2003.

NEWMAN, D.K.; AHMANN, D.; MOREL, F.M.M. A brief review of arsenate respiration. **Geomicrobiology Journal**, London, v. 15, p. 255-268, 1998.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from Cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, n. 8, p. 3327-3332, 1997.

OLIVEIRA, A.P.G.; RIBEIRO, A.A.; WASSOUF JUNIOR, E.R.; SOUZA, G.F.; BERNARDI, I.; PENATTI, N.C.; ALMEIDA, T.I.R.; PARANHOS FILHO, A.C. Uso de sensoriamento remoto na quantificação das lagoas do Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 15, 2011, Curitiba. **Anais...** Curitiba: SBSR; São José dos Campos: INPE, 2011. p. 3695.

OLSON, J.B.; STEPPE, T.F.; LITAKER, R.W.; PAERL, H.W. N₂-fixing microbial consortia associated with the ice cover of Lake Bonney, Antarctica. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p. 231–238, 1998.

OREN, A. Microbiological studies in the dead sea: future challenges toward the understanding of life at the limit of salt concentrations. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 405, p. 1–9, 1999.

_____. The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 466, p. 61–72, 2001.

_____. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 28, p. 56-63, 2002.

OREN, A.; BAXTER, B.K.; WEIMER, B.C. Microbial communities in salt lakes: phylogenetic diversity, metabolic diversity, and in situ activities. **Natural Resources and Environmental Issues**, Saline Lakes Around the World, Utah, v. 15, p. 257-263, 2009.

PAERL, H.W., PINCKNEY, J.L., STEPPE, T.F. Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. **Environmental Microbiology**, New York, v. 2, n. 1, p. 11-26, 2000.

PARKS, D.H.; BEIKO, R.G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, p. 715–721, 2010.

PENN, K.; WANG, J.; FERNANDO, S.C.; THOMPSON, J.R. Secondary metabolite gene expression and interplay of bacterial functions in a tropical freshwater cyanobacterial bloom. **The ISME Journal**, London, v. 8, p. 1866-1878, 2014.

PIKUTA, E.V.; HOOVER, R.B. Microbial extremophiles at the limits of life. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 33, p. 183-209, 2007.

POLY, F.; MONROZIER, L.J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, Paris, v. 152, p. 95-103, 2001.

POST, F.J.; STUBE, J.C. A microcosm study of nitrogen utilization in the Great Salt Lake, Utah. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 158, p. 89–100, 1988.

- POTT, A. Ecosistema Pantanal. In: PUIGNOU, J.P. (Ed.). **Utilization y manejos de pastizales**. Montevideo: IICA, PROCISUR, 1994. p. 31-44.
- PRICE, M.N.; DEHAL, P.S.; ARKIN, A.P. Fast tree: computing large minimum-evolution trees with profiles instead of a distance matrix. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 26, p. 1641-1650, 2009.
- QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, London, v. 41, p. 590-596, 2012.
- QUEIROZ-NETO, J.P.; SAKAMOTO, A.Y.; LUCATI, H.M.; FERNANDES, E. Dinâmica hídrica em uma lagoa salina e seu entorno na área do Leque, Nhecolândia, Pantanal - MS. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SOCIOECONÔMICOS DO PANTANAL, **Anais...** Corumbá: EMBRAPA Pantanal, 1999. p. 143-149.
- RADAM-Brasil. **Projeto RADAMBRASIL**. Rio de Janeiro: Ministério das Minas e Energia, 1982. 236 p. (Levantamento de Recursos Naturais, 27).
- RAMPELOTTO, P.H. Resistance of microorganisms to extreme environmental conditions and its contribution to astrobiology. **Sustainability**, Madrid, v. 2, p. 1602-1623, 2010.
- REBOLÇAS, A.C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J.G. **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação**. 3. ed. São Paulo: Ed. Escrituras, 2006. 720 p.
- REEDER, J.; KNIGHT, R. Rapid denoising of pyrosequencing amplicon data: exploiting the rank-abundance distribution. **Nature Methods**, New York, v. 7, p. 668–669, 2010.
- REZENDE FILHO, A.T.; FURIAN, S.; VICTORIA, R.L.; MASCRÉ, C.; VALLES, V.; BARBIÉRO, L. Hydrochemical variability at the Upper Paraguay basin and Pantanal wetland. **Hydrology and Earth System Sciences**, Munich, v. 16, p. 2723-2737, 2012.
- RICHARDS, L. **Diagnosis and improvement of saline and alkali soils**. Washington: USDA, 1985. 160 p. (USDA. Handbook, 69).
- RIESENFELD, C.S.; GOODMAN, R.M.; HANDEISMAN, J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, New York, v. 6, n. 9, p. 981–989, 2004.
- ROBINSON, J.; TUOVINEM, O.H. Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical, and genetic analyses. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 48, p. 95-124, 1984.
- ROTHSCHILD, L.J.; MANCINELLI, R.L. Life in extreme environments. **Nature**, Londres, v. 409, p. 1092-1101, 2001.

SAKAMOTO, A.Y. **Dinâmica hídrica em uma lagoa Salina e seu entorno no Pantanal da Nhecolândia**: contribuição ao estudo das relações entre o meio físico e a ocupação, Fazenda São Miguel do Firme. 1997. 188 p. Tese (Doutorado em Geografia Física) – Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

SANTOS, K.R.S. **Estudos de desenvolvimento, moleculares e do potencial biotecnológico em cepas de cianobactérias provenientes de lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil: *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales) e *Arthrospira platensis* (Oscillatoriales)**. 2013. 124 p. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2013.

SANTOS, K.R.S.; SANT'ANNA, C.L. Cianobactérias de diferentes tipos de lagoas (“salina”, “salitrada” e “baía”) representativas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 61-83, 2010.

SHRIDHAR, B.S. Review: nitrogen fixing microorganism. **International Journal of Microbiological Research**, Navi Mumbai, v. 3, n. 1, p. 46-52, 2012.

SIDDIQUE, T.; OKEKE, B.C.; ZHANG, Y.; ARSHAD, M.; HAN, S.K.; FRANKENBERGER, W.T. Bacterial diversity in selenium reduction of agricultural drainage water amended with rice straw. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 34, n. 1, p. 217-226, 2005.

SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. Effect of salinity on soil microorganisms. In: SORIANO, M.C.H. (Ed.). **Soil health and land use management**. Leuven: InTech, 2012. p. 177-198.

SILVA, J.S.V.; ABDON, M.M. Delimitação do pantanal brasileiro e suas sub-regiões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. esp., p. 1703-1711, 1998.

SILVER, S.; HOBMAN, J.L. Mercury microbiology: resistance systems, environmental aspects, methylation and human health. **Microbiology Monographs**, Münster, v. 6, p. 357-370, 2007.

SIMONET, P.; GROSJEAN, M.C.; MISRA, A.K.; NAZARET, S.; COURNOYER, B.; NORMAND, P. Frankia genus-specific characterization by polymerase chain reaction, **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 57, p. 3278–3286, 1991.

SOROKIN, D.Y.; BERBEN, T.; MELTON, E.D.; OVERMARS, L.; VAVOURAKIS, C.; MUYZER, G. Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. **Extremophiles**, Amsterdam, v. 18, p. 791-809, 2014.

SOUZA, V.F.; SANTORO, A.L.; WEERELT, M.V.; ENRICH-PRAST, A. Sediment denitrification, dnra and anammox rates in tropical floodplain lake (Pantanal, Brazil). **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 4, p. 734-744, 2012.

STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman & Hall, 1992. 943 p.

STOLZ, J.F.; BASU, P.; SANTINI, J.M.; OREMLAND, R.S. Arsenic and selenium in microbial metabolism. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 60, p. 107-130, 2006.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 58 p. (Embrapa. CNPAB. Documentos, 93).

TAKAMATSU, T.; KAWASHIMA, M.; KOYAMA, M. The role of Mn^{2+} -rich hydrous manganese oxide in the accumulation of arsenic in lake sediments. **Water Research**, Medmenham, v. 19, n. 8, p. 1029-1032, 1985.

TANGO, M.S.A.; ISLAM, M.R. Potential of extremophiles for biotechnological and petroleum applications. **Energy Sources**, New York, v. 24, p. 543–559, 2002.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T.F. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, Washington, v. 296, n. 5570, p. 1064-1066, 2002.

VAZ, M.G.M.V.; GENUÁRIO, D.B.; ANDREOTE, A.P.D.; MALONE, C.F.S.; SANT'ANNA, C.L.; BARBIÉRO, L.; FIORE, M.F. *Pantalinema* gen. nov. *Alkalinema* gen. nov.: two novel pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolates from saline-alkaline lakes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 64, p. 1-27, 2015.

VENTOSA, A.; ARAHAL, D.R. Physico-chemical characteristics of hypersaline environments and their biodiversity. In: GERDAY, C.; GLANSDORFF, N. **Extremophiles**. Paris: Encyclopedia of Life Support Systems, 2003. v. 2, p. 247-262.

WARREN, L.A.; HAACK, E.A. Biogeochemical controls on metal behavior in freshwater environments. **Earth-Science Reviews**, London, v. 54, p. 261-320, 2001.

WEEGER, W.; LIEVREMONT, D.; PERRET, M.; LAGARDE, F.; HUBERT, J.C. LEROY, M.; LETT, M.C. Oxidation of arsenite to arsenate by bacterium isolated from aquatic environment. **Biometals**, Tucson, v. 12, p. 141-149, 1999.

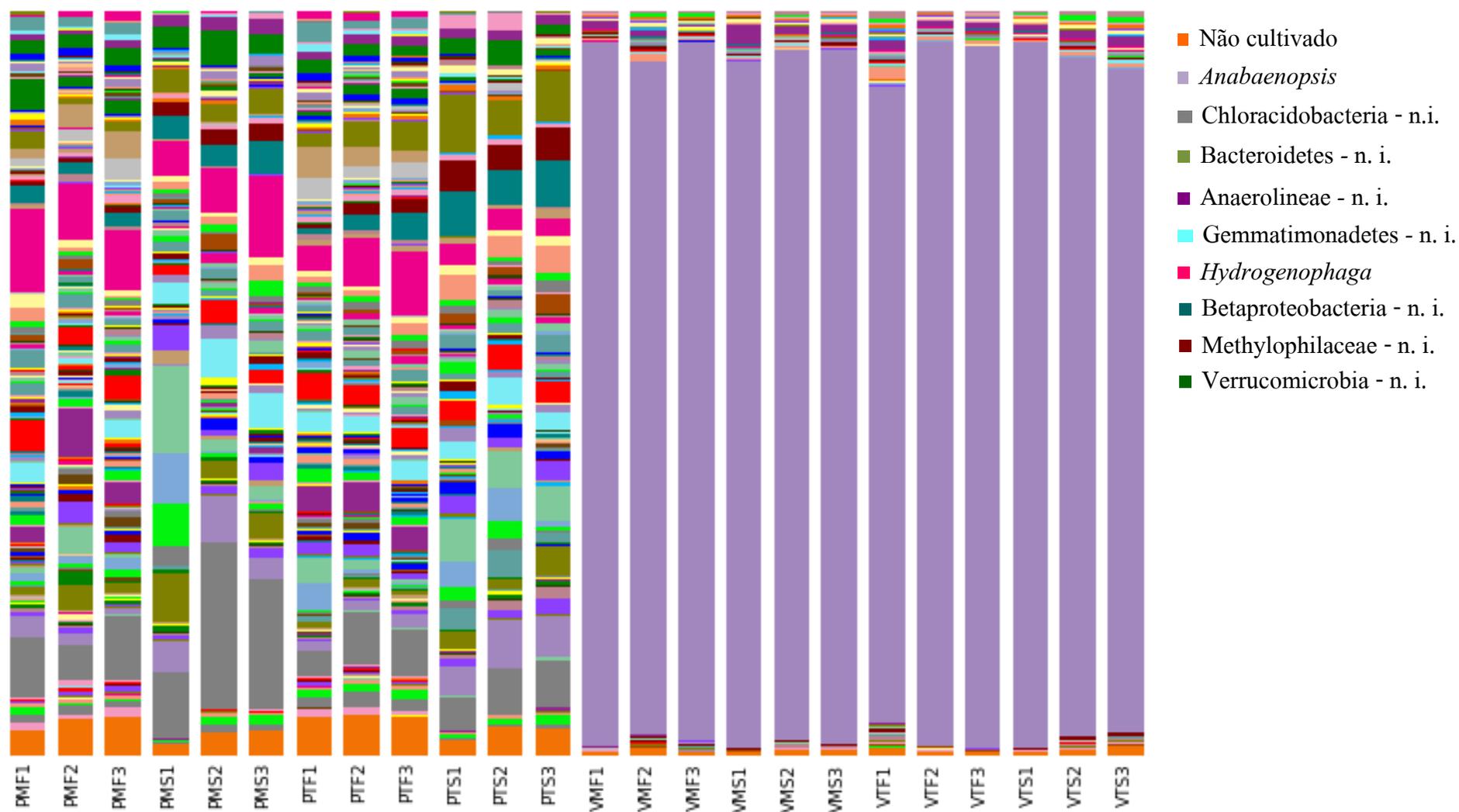
WILLINK, P.W.; CHERNOFF, B.; ALONSO, L.E.; MONTAMBAULT, J.R.; LOURIVAL, R. **A biological assessment of the aquatic ecosystems of the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil**. Washington: RAP Bulletin of Biological Assessment – Conservation International, 2000. 306 p.

WU, Q.L.; ZWART, G.; SCHAUER, M.; KAMST-VAN AGTERVELD, M.P.; HAHN, M.W. Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 72, p. 5478-5485, 2006.

ZHANG, Y.; TURANOV, A.A.; HATFIELD, D.L.; GLADYSHEV, V.N. *In silico* identification of genes involved in selenium metabolism: evidence for a third selenium utilization trait. **BMC Genomics**, London, v. 9, n. 251, p. 1-13, 2008.

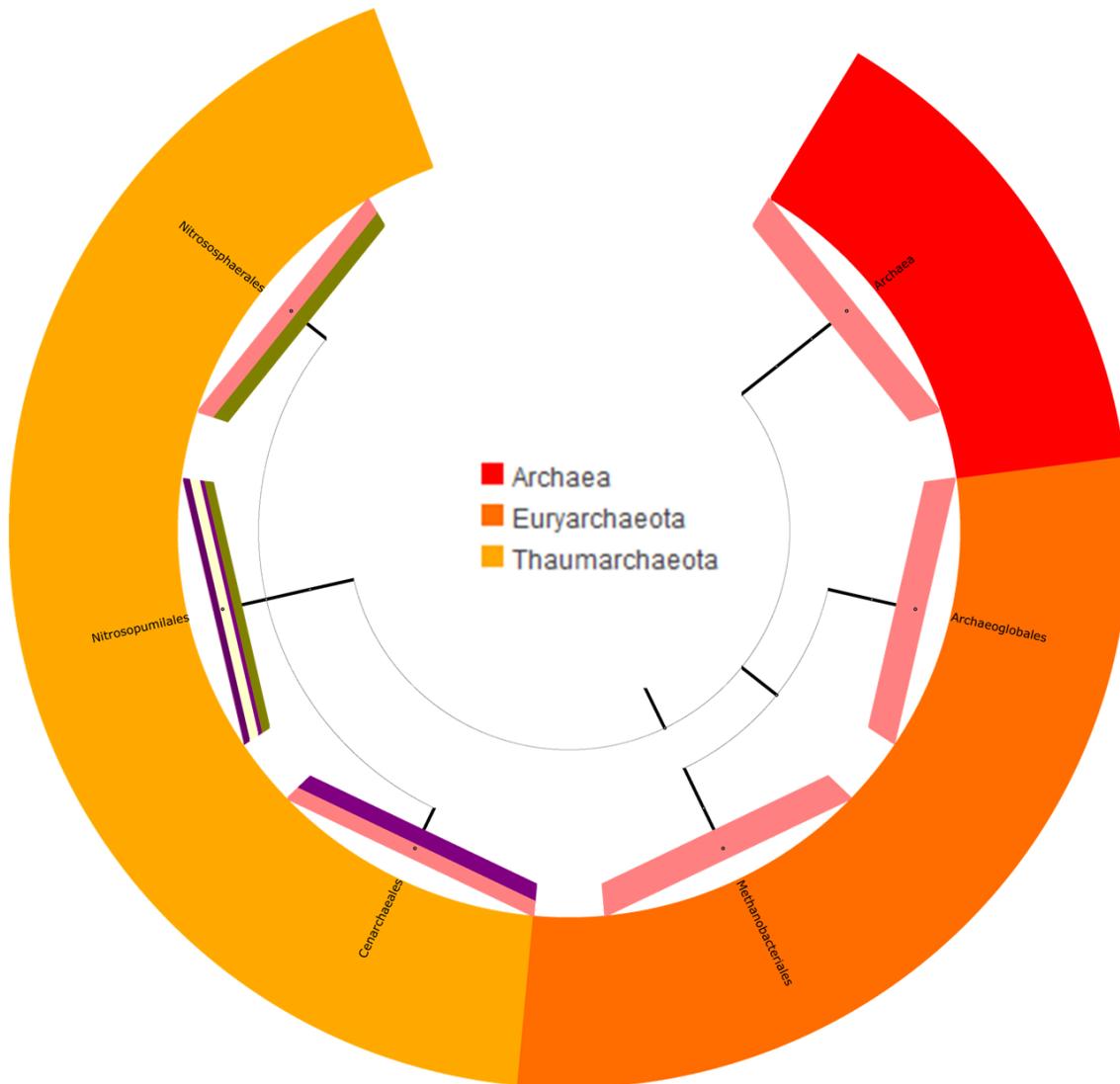
APÊNDICES

Apêndice A - Frequência dos gêneros bacterianos encontrados nas salinas Verde e Preta do Pantanal brasileiro. Classificação realizada utilizando o programa QIIME , com o sistema de classificação RDP

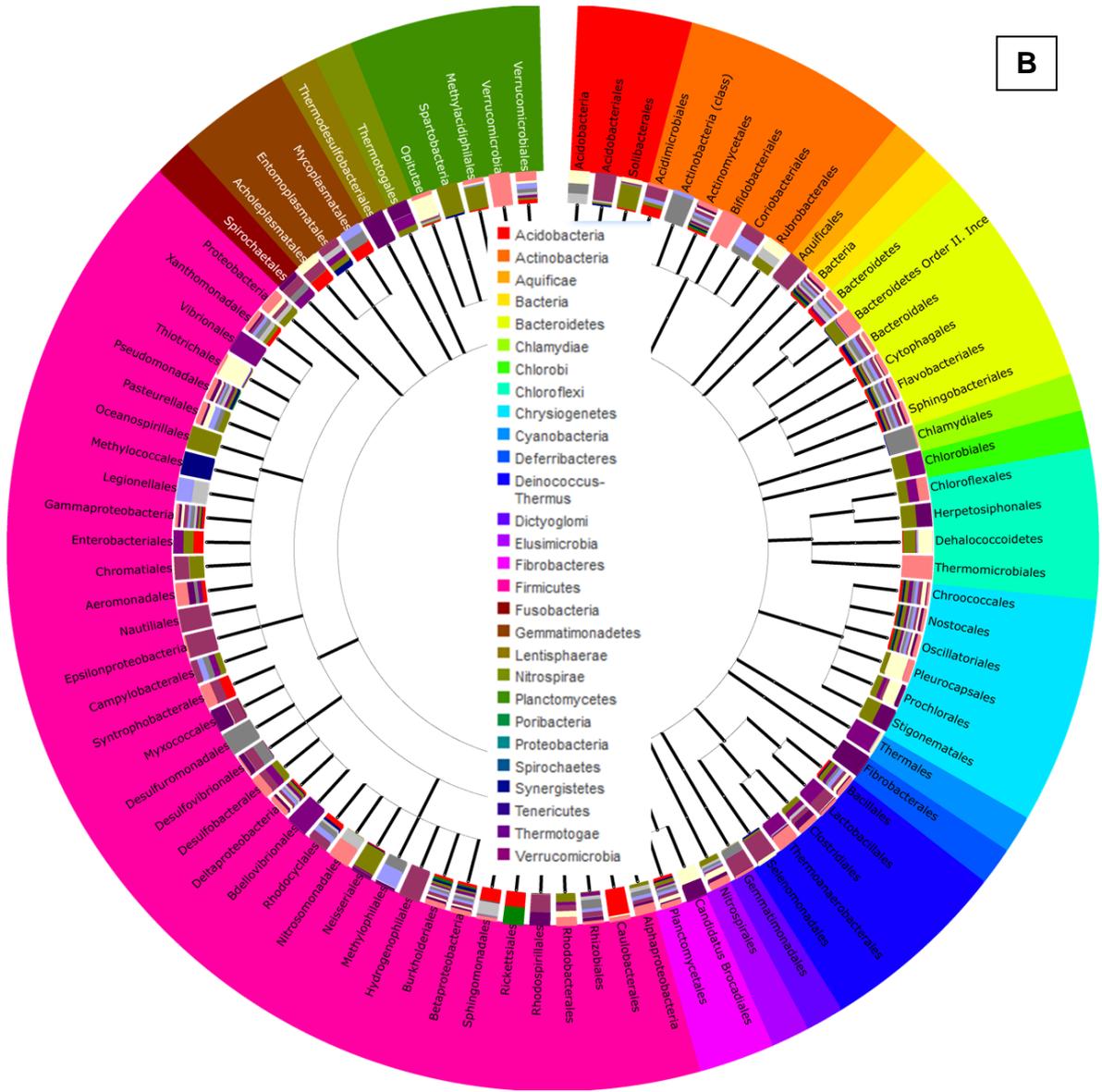


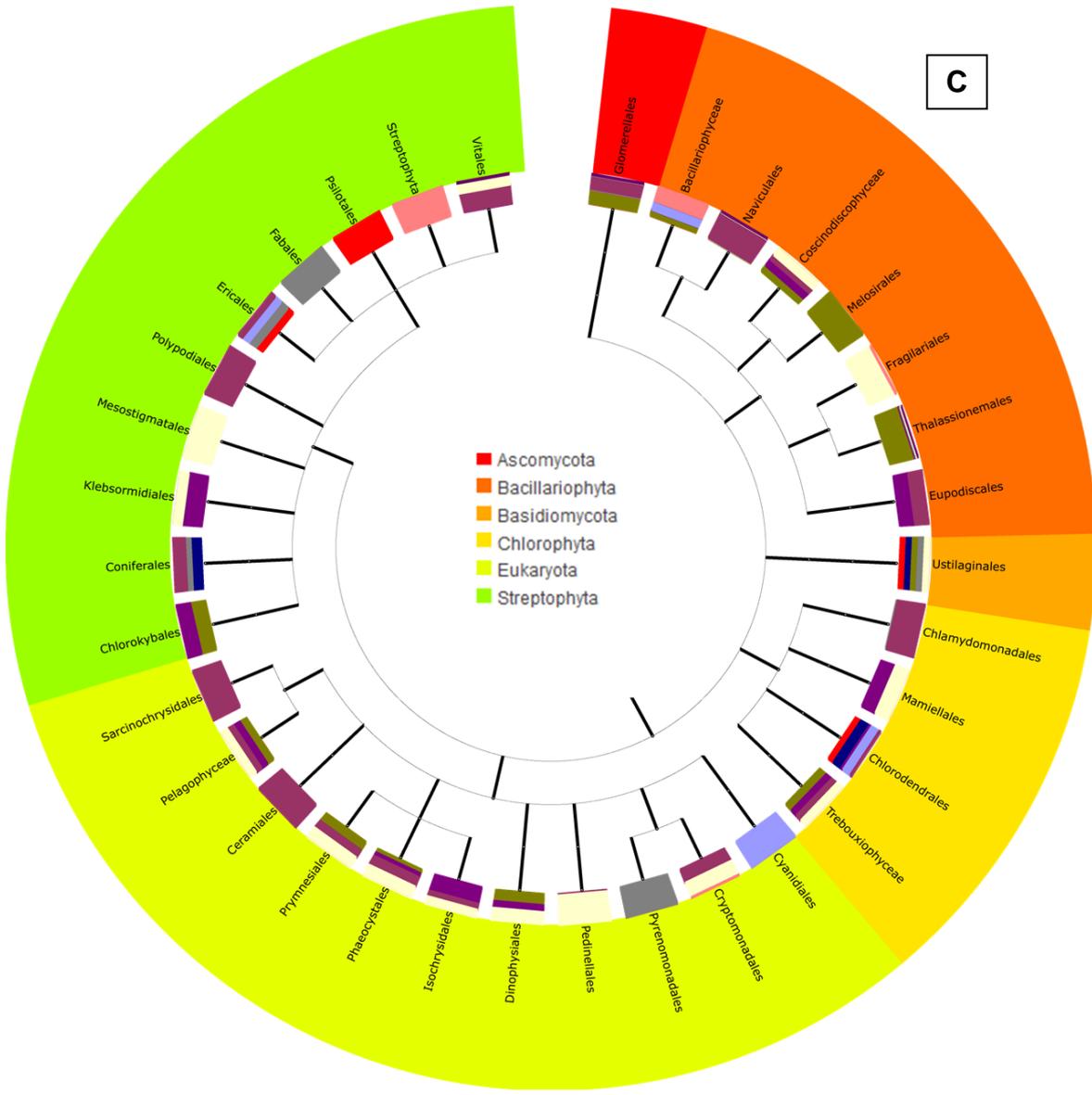
Apêndice B - Filos dos domínios Archaea (A), Bacteria (B) e Eukarya (C) obtidos no sequenciamento metagenômico da salina Preta do Pantanal brasileiro

A



B





Apêndice B - Filos dos domínios Archaea (a), Bacteria (b) e Eukarya (c) obtidos no sequenciamento metagenômico da salina Verde do Pantanal brasileiro

