

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

Diversidade de *Bacteria* e *Archaea* em solos de mangue e marisma

Juliano de Carvalho Cury

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2006**

Juliano de Carvalho Cury
Engenheiro Agrônomo

Diversidade de *Bacteria* e *Archaea* em solos de mangue e marisma

Orientador:
Prof. Dr. **MARCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola.

Piracicaba
2006

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Cury, Juliano de Carvalho
Diversidade de *Bacteria e Archaea* em solos de mangue e marisma / Juliano de
Carvalho Cury. -- Piracicaba, 2006.
151p. : il.

Tese (Doutorado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. DNA 2. Ecologia microbiana 3. Ecossistemas de mangue 4. Ecossistemas
estuarinos 5. Solos I. Título

CDD 631.4

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

“Sabemos mais sobre o movimento dos corpos celestes do que sobre o solo debaixo de nossos pés”

Leonardo da Vinci (1452 – 1519).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais pela orientação.

Ao CNPq e à CAPES, pelas bolsas concedidas.

À Coordenação do PPG Microbiologia Agrícola e à ESALQ, pela oportunidade.

Aos colegas Adriana, Augusto, Carolina, Christie, Daniel, Daniele, Denise, Eduardo, Felipe, Gisele, Hélio, LÍlian, Lucas, Lucia, Marcio, Pablo, Rafael, Renato, Ricardo, Robinson, Silvia, Simão, Soraya, Tiago, Valdomiro e Vivian, pelo convívio.

Aos técnicos de laboratório Denise, Fernando e Vladimir, pelos auxílios.

À Profa. Dra. Helaine Carrer, pela permissão do uso das instalações do CEBTEC e à técnica Fátima.

Ao Prof. Dr. Luiz L. Coutinho, pela permissão do uso das instalações do Laboratório de Biotecnologia Animal e à técnica Nirlei.

A Heitor Villa-Lobos, Ravi Shankar e Chet Baker, cujas composições foram fundamentais quando foram necessárias a calma e a concentração.

À minha família e à Camila, pelo apoio e carinho.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
Referências	14
2 VARIAÇÕES DAS ESTRUTURAS DAS COMUNIDADES DE <i>BACTERIA</i> E <i>ARCHAEA</i> EM SOLOS DE MANGUE SOB DIFERENTES VEGETAÇÕES.....	21
Resumo	21
Abstract.....	22
2.1 Introdução.....	23
2.2 Desenvolvimento.....	24
2.2.1 Material e métodos	24
2.2.1.1 Área de estudo e amostragem.....	24
2.2.1.1.2 Amostras utilizadas na comparação de diferentes condições de vegetação	25
2.2.1.1.3 Amostras utilizadas na comparação da variação temporal das estruturas das comunidades de procariotos de sedimento sem vegetação e solo com <i>Spartina alterniflora</i>	25
2.2.1.2 Extração do DNA	26
2.2.1.3 PCR-DGGE	26
2.2.2 Resultados.....	28
2.2.2.1 Comparação de diferentes condições de vegetação.....	28
2.2.2.2 Comparação da variação temporal das estruturas das comunidades de procariotos de sedimento sem vegetação e solo com <i>Spartina alterniflora</i>	31
2.2.3 Discussão	31
2.3 Conclusões.....	37
Referências	37
3 DIVERSIDADE DE <i>BACTERIA</i> EM SOLOS DE MANGUE E MARISMA	41
Resumo	41
Abstract.....	42
3.1 Introdução.....	43
3.2 Desenvolvimento.....	44

3.2.1 Material e métodos	44
3.2.1.1 Área de estudo e amostragem.....	44
3.2.1.2 Extração do DNA	44
3.2.1.3 Bibliotecas de rDNA 16S	45
3.2.1.4 Análises das seqüências de rDNA 16S.....	46
3.2.2 Resultados.....	47
3.2.3 Discussão	63
3.2.3.1 Grupos taxonômicos de <i>Bacteria</i> encontrados em solos de mangue e marisma	63
3.2.3.1.1 <i>Acidobacteria</i>	63
3.2.3.1.2 <i>Actinobacteria</i>	64
3.2.3.1.3 <i>Bacteroidetes</i>	64
3.2.3.1.4 <i>Chloroflexi</i>	65
3.2.3.1.5 <i>Cyanobacteria</i>	65
3.2.3.1.6 <i>Deferribacteria</i>	66
3.2.3.1.7 <i>Firmicutes</i>	66
3.2.3.1.8 <i>Gemmatimonadetes</i>	66
3.2.3.1.9 <i>Nitrospirae</i>	66
3.2.3.1.10 <i>Planctomycetes</i>	67
3.2.3.1.11 <i>Proteobacteria</i>	67
3.2.3.2 Diversidade de <i>Bacteria</i> em solos de mangue e marisma	71
3.3 Conclusões.....	74
Referências	75
4 ESTRUTURA DAS COMUNIDADES DE PROCARIOTOS E DIVERSIDADE DE <i>ARCHAEA</i> EM UM PERFIL DE SEDIMENTO DE CANAL DE MANGUE	86
Resumo	86
Abstract.....	87
4.1 Introdução.....	88
4.2 Desenvolvimento.....	89
4.2.1 Material e métodos	89
4.2.1.1 Área de estudo e amostragem.....	89
4.2.1.2 Extração do DNA	90

4.2.1.3 PCR-DGGE	91
4.2.1.4 Bibliotecas de rDNA 16S	91
4.2.1.5 Análises das seqüências de rDNA 16S.....	91
4.2.2 Resultados.....	91
4.2.3 Discussão	95
4.3 Conclusões.....	110
Referências	111
5 ESTRUTURA DAS COMUNIDADES DE PROCARIOTOS E DIVERSIDADE DE <i>BACTERIA</i> EM UM PERFIL DE SOLO DE MARISMA.....	117
Resumo	117
Abstract.....	118
5.1 Introdução	119
5.2 Desenvolvimento	120
5.2.1 Material e métodos	120
5.2.1.1 Área de estudo e amostragem.....	120
5.2.1.2 Extração do DNA	120
5.2.1.3 PCR-DGGE	120
5.2.1.4 Bibliotecas de rDNA 16S	120
5.2.1.5 Análises das seqüências de rDNA 16S.....	121
5.2.2 Resultados.....	121
5.2.3 Discussão	122
5.3 Conclusões.....	134
Referências	134
ANEXO	139

RESUMO

Diversidade de *Bacteria* e *Archaea* em solos de mangue e marisma

Estudos sobre a diversidade de *Bacteria* em solos de mangue (Brasil) e marisma (Espanha) são escassos. A vegetação de mangue, composta por espécies como *Spartina alterniflora*, *Rhizophora mangle*, *Avicennia schaueriana* e *Laguncularia racemosa*, pode ser um dos fatores que determinam a estruturação das comunidades de procariotos. Determinações das estruturas das comunidades e de diversidade de *Bacteria* podem ocorrer em função das diferentes condições físico-químicas dos solos, refletindo na configuração dos processos biogeoquímicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variação das estruturas das comunidades de *Bacteria* e *Archaea*, bem como a diversidade, em solos de mangue e marisma utilizando DGGE e sequenciamento parcial do rDNA 16S. As estruturas das comunidades de procariotos apresentaram variações em função de condições de vegetação. *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* estão presentes em todos os solos estudados. A comunidade de *Bacteria* destes ambientes é dominada por *Proteobacteria*. Vários dos táxons detectados estão relacionados com ciclos biogeoquímicos importantes para os ambientes estudados. As estimativas não-paramétricas de riqueza de espécies (ACE e Chao1) mostram que solos de mangue e marisma podem conter milhares de espécies de bactérias. As comunidades de *Bacteria* dos solos de mangue e marisma são significativamente diferentes. Na camada mais superficial do sedimento de mangue predomina *Euryarchaeota* metanogênicas enquanto que na camada mais profunda predomina *Crenarchaeota*. Bactérias das ordens *Desulfobacterales*, *Desulfovibrionales* e *Desulfuromonales* podem estar relacionadas com a atividade de sulfato-redução e formação de pirita na camada anaeróbia do perfil de solo de marisma. De uma maneira geral, pode-se concluir que a diversidade e estrutura das comunidades de procariotos de ambientes estuarinos pode variar em função da vegetação estabelecida e do tipo de ambiente. Adicionalmente, solos de mangue e marisma possuem grande diversidade de procariotos, grande parte da qual é desconhecida, podendo representar elevado potencial genético para utilização biotecnológica.

Palavras-chave: mangue; marisma; solo; diversidade microbiana; microrganismos; *Bacteria*; rDNA 16S; DGGE.

ABSTRACT

Bacterial and Archaeal diversity in mangrove and marisma soils

The bacterial diversity in mangrove (Brazil) and marisma (Espanha) soils are largely unknown. Bacterial communities participate in biogeochemicals processes that occurs in soils of estuarine ecosystems. Determinations of the bacterial communities structures and diversity can occur in function of different physico-chemical conditions, reflecting in the biogeochemical processes. The aim of this work was to evaluate the variation of bacterial an archaeal communities structures utilizing DGGE and partial sequencing of 16S rDNA. Bacterial community structures showed more similarity between repetitions samples than the areas under different vegetation. Phylogenetic affiliation shows that several sequences were not clamped into known phyla. *Proteobacteria* prevails in bacterial communities of mangrove and marisma soils. Several taxa detected are associated to important biogeochemical cycles that occur in estuarine ecosystems. Analysis of species richness showed that mangrove and marisma soils can contain 200 to 6000 species of bacteria. Methanogenic *Euryarchaeota* was found specially in the upper sample of mangrove sediment analysed whereas the *Crenarchaeota* was found specially in the lower. Based on the data obtained, it can be concluded that the vegetation is one of the factors affecting the structure of bacterial and archaeal communities in mangrove soils. Additionally, the effects of edafic factors and seasonal variations have to be considered as determining the prokaryotic community sctructures, and bacterial and archaeal communities can respond independently to the factors that determine their community structures. Bacterial diversity can vary with the studied estuarine ecosystem. Studies are necessary concerning to diversity of *Bacteria*, it variation and correlation with biogeochemical process in the mangrove and marisma soils. These soils show a great diversity of bacteria, much of than unknown, which represent a great genetic potential to the biotechnology.

Keywords: mangrove; marisma; sediment; soil; microbial diversity; microorganisms; *Bacteria*; *Archaea*; 16S rDNA.

1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas estuarinos são formados em regiões de interação do ambiente terrestre com rios e oceano e desempenham papel essencial na manutenção da biodiversidade marinha, funcionando como berçário e fonte de alimento para peixes e outros animais, já que são ambientes altamente produtivos devido ao intenso suprimento de nutrientes (GETTER et al., 1984; SHRIADAH, 1999; McLUSKY; ELLIOT, 2004).

Os mangues e as planícies de maré associadas são considerados habitats econômica e ecologicamente importantes nas regiões costeiras tropicais. Estão associados a regiões onde há encontro de águas de rios e mar ou que estão diretamente expostos à linha da costa, às margens de baías, enseadas, barras, desembocaduras de rios, lagunas e reentrâncias das regiões de planícies costeiras ou vales alagados limitados por baixios e a estuários e deltas. Possuem águas não perturbadas, ricas em material em suspensão, constituindo ecossistemas de baixa energia (VANNUCCI, 1999). Sua formação e evolução estão associadas ao aporte de materiais sedimentares provenientes tanto do mar quanto do continente, tornando-os ambientes de transição de alta produtividade (DeLAUNE; PATRICK; BURESH, 1978; WOODWELL et al., 1978). Por serem ambientes de baixa energia, seus solos apresentam predominância de frações finas (silte e argila) e elevadas concentrações de matéria orgânica e sais solúveis (CINTRÓN; SCHAEFFER-NOVELLI, 1983). No Brasil podem ser encontrados desde o extremo norte, no Amapá, até o sul de Santa Catarina, na foz do Rio Araranguá, cobrindo uma área de cerca de 25.000 km², dos quais, cerca de 231 km² estão localizados no Estado de São Paulo (YOKOYA, 1995; LAMPARELLI, 1998; SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000).

Ecossistemas igualmente importantes encontram-se no litoral Noroeste da Espanha e são denominadas Rias. Esses ecossistemas se caracterizam por extensas reentrâncias de até 20 km de extensão por 1 a 5 km de largura onde se formam as marismas.

A caracterização da flora e fauna dos ambientes estuarinos tem sido objeto de vários estudos (MACHADO et al., 2002; PINHEIRO, 2003; BERNINI; REZENDE, 2004; COHEN et al., 2005; FLEMER; CHAMP, 2006; HATTORI). Nos últimos anos, vários trabalhos têm sido feitos para caracterizar os solos de mangue (PRADA-GAMERO, 2001; FERREIRA, 2002, 2006; FIRME, 2003; SOUZA-SILVA, 2005; SOUZA-JÚNIOR, 2006) e marisma (OTERO; MACÍAS, 2003), sendo dada, em alguns deles, especial atenção a importantes processos biogeoquímicos

característicos destes ambientes. A caracterização biogeoquímica de outros ambientes estuarinos, principalmente os chamados “salt marshes”, tem sido realizada (SHERMAN; FAHEY; HOWARTH, 1998; KRISTENSEN et al., 2000; GLEASON; EWEL; HUE, 2003; NIELSEN; KRISTENSEN; MACINTOSH, 2003; MARCHAND et al., 2004;).

Um dos processos biogeoquímicos de maior importância nesses ambientes é a redução bacteriana do sulfato e conseqüente piritização. A reduzida difusão de O_2 devido à saturação do solo com água faz com que a matéria orgânica passe a ser degradada por bactérias que irão utilizar receptores de elétrons alternativos na seguinte seqüência termodinâmica: $NO_3^- > Mn^{4+} > Fe^{3+} > SO_4^{2-} > CO_2 > N_2 > H^+$ (FROELICH et al., 1979; SCHULZ, 2000). A abundância de SO_4^{2-} e Fe^{3+} nos solos de mangue e marisma (HILL, 1982) faz com que estes sejam utilizados e reduzidos a sulfeto e Fe^{2+} , que combinados podem formar pirita (FeS_2), um mineral estável nestas condições. Na ausência de Fe^{2+} , o sulfeto produzido pode se difundir para as camadas mais superficiais do solo, onde a difusão de O_2 é maior, e ser re-oxidado a sulfato, fechando-se assim um ciclo biogeoquímico (ZOPFI et al., 2001). Este processo é governado por organismos distribuídos em vários táxons do domínio *Archaea* e de filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Nitrospira* e *Thermodesulfobacteria* do domínio *Bacteria*.

Apesar de se saber que a organização e funcionamento das comunidades microbianas são responsáveis pela maior parte destes processos biogeoquímicos (LYNCH; BRAGG, 1985), estudos de caracterização destas comunidades nos sedimentos e solos de mangues e marismas são escassos, ao contrário do que ocorre para outros ecossistemas estuarinos (FRANKLIN et al., 2002; PURDY et al., 2002; BUCHAN et al., 2003; SMITH et al., 2004; LANOIL et al., 2005). Além disso, ambientes como estes, cujas comunidades microbianas são ainda pouco conhecidas, podem significar grandes bancos genéticos para a pesquisa e desenvolvimento de produtos biotecnológicos, considerando que os microrganismos representam as formas de vida mais abundantes e diversificadas do planeta, e detêm a maior proporção da diversidade genética existente (BENLLOCH; MARTINEZ-MURCIA; RODRIGUEZ-VALERA, 1995; LAMBAIS et al., 2005).

Estudos têm mostrado que os solos em geral possuem uma imensa diversidade e abundância de microrganismos (BOHANNAN; HUGHES, 2003), podendo conter dezenas de milhares de espécies em apenas um grama (ØVREÅS; TORSVIK, 1998; CURTIS; SLOAN; SCANNELL, 2002; TORSVIK; ØVREÅS, 2002; VALINSKY et al., 2002). Segundo estimativas

de Whitman; Coleman e Wiebe (1998), aproximadamente 4,5 a 6,5% dos procariotos ocorrem na superfície de ambientes terrestres, 2 a 3% nas águas dos oceanos e a vasta maioria em sub-superfícies (abaixo de 8 cm em ambientes terrestres e 10 cm em sedimentos marinhos). No entanto, a maior parte das espécies de procariotos presentes nos oceanos e ambientes terrestres sub-superficiais permanece desconhecida (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998).

Durante muito tempo foi bastante limitada a capacidade de se realizar estudos sobre a diversidade de procariotos dos solos, já que uma pequena porcentagem (0,1% a 0,5%) podia ser acessada pelos métodos convencionais, com base em cultivo (TORSVIK; GOKSOYR; DAAE, 1990). Esses estudos são feitos utilizando-se técnicas independentes de cultivo, através da análise do DNA metagenômico extraído do ambiente (TORSVIK; ØVREÅS, 2002), aliadas a importantes avanços na bioinformática e estatísticas.

As análises de estrutura de comunidades de procariotos utilizando as informações da seqüência do gene que codificam a subunidade 16S do RNA ribossômico (rDNA 16S) têm se tornado cada vez mais difundidas. Este gene possui características fundamentais que possibilitam sua utilização em estudos de ecologia, tais como: presença de regiões com seqüência de nucleotídeos hipervariáveis entre regiões conservadas; presença em todos os procariotos; e aparente ausência de transferência genética lateral; e tamanho considerado satisfatório, de cerca de 1500 nucleotídeos, para estudos filogenéticos (AMANN; LUDWIG, 2000).

A variabilidade nas seqüências do rDNA 16S pode ser avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) ou por sequenciamento de nucleotídeos. A DGGE foi utilizada primeiramente por Muyzer; Waal e Uitterlinden (1993) e consiste na separação dos fragmentos de DNA de mesmo tamanho em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear dos desnaturantes formamida e uréia. As variações na composição de nucleotídeos dos diferentes fragmentos de DNA determinam seu comportamento de migração no gel, fazendo com que fragmentos com diferentes concentrações de G + C migrem em posições diferentes.

Nos últimos anos o sequenciamento do rDNA 16S de procariotos também tem sido muito utilizado em estudos de diversidade, caracterização de comunidades complexas de procariotos e taxonomia, levando à existência de um considerável volume de informações em bancos de dados públicos (CHELIUS; TRIPLETT, 2001; DERAKSHANI; LUKOW, LIESACK, 2001; LAMBAIS et al., 2005).

As seqüências geradas com a utilização deste método representam uma grande quantidade de dados que precisam ser processadas com o auxílio de algoritmos específicos (LAMBAIS et al., 2005) e posteriormente podem ser utilizadas para diferentes tipos de análises. Através de bancos de dados públicos como o GenBank do NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e o Ribosomal Database Project (RDP - <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>), é possível comparar seqüências geradas com seqüências depositadas nos bancos e inferir sua afiliação taxonômica. Com este objetivo foi criado por pesquisadores do SIMO (Sapelo Island Microbial Observatory - <http://simo.marsci.uga.edu/>) da Universidade da Geórgia – EUA o RDPquery (http://simo.marsci.uga.edu/public_db/rdp_query.htm), um programa que permite a classificação taxonômica de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria*. Este mesmo grupo de pesquisa desenvolveu o LIBSHUFF (SINGLETON et al., 2001 - <http://www.arches.uga.edu/%7Ewhitman/libshuff.html>), um programa que permite fazer comparações de bibliotecas de seqüências de rDNA 16S e determina se as comunidades as quais elas representam são ou não estatisticamente diferentes.

Várias abordagens estatísticas têm sido utilizadas para estimar e comparar a diversidade de procariotos, bem como as estruturas de suas comunidades em diferentes ambientes. Normalmente a diversidade e a estrutura de comunidades microbianas são analisadas em função da ocorrência de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) ou filotipos, já que o conceito de espécie, principalmente para os procariotos, é controverso (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001). Essas UTOs podem ser bandas detectadas após DGGE (FELSKE et al., 1997; LIU et al., 1997; DUNBAR et al., 1999) ou seqüências de rDNA 16S (BOND et al., 1995; McCAIG; GLOVER; PROSSER, 1999), sendo esta última opção a que apresenta resultados mais confiáveis (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Os critérios para a definição das UTOs não são consensuais, principalmente quando se discute a distância evolutiva limite para que uma seqüência represente uma UTO. Normalmente seqüências com similaridade >97% são consideradas da mesma espécie, >95%, do mesmo gênero e >80%, do mesmo filo (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994; BOND et al., 1995; BORNEMAN; TRIPLETT 1997; HUGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998; EVERETT; BUSH; ANDERSEN, 1999; McCAIG et al., 1999; SAIT et al., 2002). Schloss e Handelsman (2005) consideram que estes valores de “cutoff” são os que mais se adequam à taxonomia histórica, mas ainda não podem ser considerados rigorosamente válidos para uma classificação hierárquica precisa. Estes

pesquisadores desenvolveram o DOTUR (Distance Based OTU and Richness Determination - <http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html>), um programa de agrupamento utilizado para definir UTOs em um conjunto de seqüências. Métodos não-paramétricos podem ser utilizados eficientemente neste contexto para estimar a diversidade a partir de uma pequena amostra da comunidade. O mais utilizado é o Chao1 (CHAO, 1987), que utiliza o número de UTOs com um e dois representantes na amostra para estimar a diversidade total. Já Chao e Lee (1992) propuseram um algoritmo chamado ACE (“Abundance-based Coverage Estimator”), no qual as UTOs (espécies) são separadas em grupos raros e abundantes, e somente os grupos raros são utilizados para estimar a diversidade não-conhecida. Através de programas como o Phylip (FELSESTEIN, 1993) ou o Paup (SWOFFORD, 2003) podem-se realizar estudos de filogenia (MARTIN, 2002; BOHANNAN; HUGHES, 2003). Essa abordagem considera a diversidade genética das comunidades, e pode ser usada para comparar a complexidade genética das mesmas. Adicionalmente, essa abordagem permite, através da análise da topologia de árvores filogenéticas, revelar processos determinantes da estrutura das comunidades (BOHANNAN; HUGHES, 2003).

Foram objetivos deste trabalho a caracterização da diversidade de procariotos e variações de suas comunidades em sedimentos e solos de mangue e marisma utilizando-se PCR-DGGE e sequenciamento de parte do rDNA 16S.

Referências

- AMANN, R.I.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **Microbiology Reviews**, New York, v. 24, p.555-565, 2000.
- BENLLOCH, S.; MARTINEZ-MURCIA, A.J.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Sequencing of bacterial and archaeal 16S rDNA genes directly amplified from a hypersaline environment. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 18, p. 574-581, 1995.
- BERNINI, E.; REZENDE, C.E. Estrutura da vegetação em florestas de mangue do estuário do rio Paraíba do Sul, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 491-502, 2004.
- BOHANNAN, J.M.B.; HUGHES, J. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, p. 282-287, 2003.

BOND, P.L.; HUGENHOLTZ, P.; KELLER, J.; BLACKALL, L.L. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1910-1916, 1995.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 2647-2653, 1997.

BUCHAN, A.; NEWELL, S.Y.; BUTLER, M.; BIERS, E.J.; HOLLIBAUGH, J.T.; MORAN, M.A. Dynamics of bacterial and fungal communities on decaying salt marsh grass. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 6676-6687, 2003.

CHAO, A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. **Biometrics**, Oxford, v. 43, p. 783-791, 1987.

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

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of *Archaea* and *Bacteria* in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, p. 252-263, 2001.

CINTRÓN, G.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Introducción a la ecología del manglar**. Montevideo: Oficina Regional de Ciencia y Tecnología de la Unesco para América Latina y el Caribe, 1983. 109 p.

COHEN, M.C.L.; SOUZA-FILHO, P.W.M.; RUBÉN, J.L.; BEHLING, H.; ÂNGULO, R.J. A model of holocene mangrove development and relative sea-level changes on the Bragança Peninsula (northern Brazil). **Wetlands Ecology and Management**, Amsterdam, v. 13, p. 433-443, 2005.

CURTIS, T.P.; SLOAN, W.T.; SCANNELL, J.W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 10494-10499, 2002.

DeLAUNE, R.D.; PATRICK, W.H.; BURESH, R.J. Sedimentation rates determined by ¹³⁷Cs dating in a rapidly accreting salt marsh. **Nature**, London, v. 275, p. 532-533, 1978.

DERAKSHANI, M.; LUKOW, T.; LIESACK, W. Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rDNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 623-631, 2001.

DUNBAR, J.; TAKALA, S.; BARNS, S.M.; DAVIS, J.A.; KUSKE, C.R. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1662-1669, 1999.

EVERETT, K.D.E.; BUSH, R.M.; ANDERSEN, A.A. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 49, p. 415-440, 1999.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

FELSESTEIN, J. P. Phylogenetic Inference Package version 3.5c. Seattle: University Washington, 1993.

FELSKE, A.; BHEIMS, H.; WOLTERINK, A.; STACKEBRANDT, E.; AKKEMANS, A.D.L. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class *Actinobacteria* in grassland soils. **Microbiology**, New York, v. 143, p. 2983-2989, 1997.

FERREIRA, T.O. **Processos pedogenéticos e biogeoquímica de Fe e S em solos de manguezais**. 2006. 141 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

FERREIRA, T.O. **Solos de mangue do rio Crumahú (Guarujá-SP): pedologia e contaminação por esgoto doméstico**. 2002. 113 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

FIRME, L.P. **Caracterização físico-química de solos de mangue e avaliação de sua contaminação por esgoto doméstico via traçadores fecais**. 2003. 70p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

FLEMER, D.A.; CHAMP, M.A. What is the future fate of estuaries given nutrient over-enrichment, freshwater diversion and low flows? **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 52, p. 247-258, 2006.

FRANKLIN, R.B.; BLUM, L.K.; McCOMB, A.C.; MILLS, A.L. A geostatistical analysis of small-scale spatial variability in bacterial abundance and community structure in salt marsh creek bank sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 42, p. 71-80, 2002.

FROELICH, P.N.; KLINKHAMMER, G.P.; BENDER, M.L.; LURDTKE, N.A.; HEATH, G.R.; CULLEN, D.; DAUPHIN, P.; HAMMOND, D.; HARTMAN, B.; MAYNARD, V. Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: Suboxic diagenesis. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, London, v. 43, p.1075-1090, 1979.

GETTER, C.D.; CINTRON, G.; DICKS, B.; LEWIS, R.R.; SENECA, E.D. The recovery and restoration of salt marshes and mangrove following an oil spill. In: CAIRNS, J.; BUIKEMA, A.L. (Ed.). **Restoration of habitats impacted by oil spills**. Boston: Butterworth, 1984. chap. 3, p.65-113.

- GLEASON, S.M.; EWEL, K.C.; HUE, N. Soil redox conditions and plant–soil relationships in a micronesian mangrove forest. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, Londres, v. 56, p. 1065–1074, 2003.
- HATTORI, G.Y.; PINHEIRO, M.A.A. Fertilidade do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* (Linnaeus) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) em Iguape (São Paulo, Brasil). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 20, p. 309-313, 2003.
- HILL, D.E. Soils in tidal marshes of northeast. **Soil Science**, Washington, v. 133, p. 298-304, 1982.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 4765-4774. 1998.
- KRISTENSEN, E.; ANDERSEN, F.O.; HOLMBOE, N.; HOLMER, M.; THONGTHAM, N. Carbon and nitrogen mineralization in sediments of the Bangrong mangrove area, Phuket, Thailand. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf Luhe, v. 22, p. 199–213, 2000.
- LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. Diversidade microbiana nos solos: Definindo novos paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L. R. F.; COOPER, M.; SILVA, A. P.; CARDOSO, E. J.. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 43-84.
- LAMPARELLI, C.C. **Mapeamento dos ecossistemas costeiros do Estado de São Paulo**. São Paulo: Cetesb, 1998. 108 p.
- LANOIL, B.D.; La DUC, M.T.; WRIGHT, M.; KASTNER, M.; NEALSON, K.H.; BARTLETT, D. Archaeal diversity in ODP legacy borehole 892b and associated seawater and sediments of the Cascadia Margin. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 54, p. 167-177, 2005.
- LIU, W.T.; MARSH, T.L.; CHENG, H.; FORNEY, L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rDNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 63, p. 4516-4522, 1997.
- LYNCH, J.M.; BRAGG, E. Microorganism and soil aggregate stability. **Advances in Soil Science**, New York, v. 2, p. 133-171, 1985.
- MACHADO, I.C.; MAIO, F.D. de; KIRA, C.S.; CARVALHO, M.F.H. Estudo da ocorrência dos metais pesados Pb, Cd, Hg, Cu e Zn na ostra de mangue *Crassostrea brasiliana* do estuário de Cananéia-SP, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 61, p. 13-18, 2002.
- MARCHAND, C.; BALTZER, F.; LALLIER-VERGÈS, E.; ALBÉRIC, P. Pore-water chemistry in mangrove sediments: Relationship with species composition and developmental stages (French Guiana). **Marine Geology**, Amsterdam, v. 208, p. 361 - 381, 2004.

- MARTIN, A.P. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3673-3682, 2002.
- McCAIG, A.E.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1721-1730, 1999.
- McLUSKY, D.S.; ELLIOT, M. **The estuarine ecosystem: Ecology, threats, and management**. Oxford: Oxford University Press, 2004. 214 p.
- MUYZER, G.; WAAL, E.C. de; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rDNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p.695-700, 1993.
- NIELSEN, O.I., KRISTENSEN, E., MACINTOSH, D.J. Impact of fiddler crabs (*Uca* spp.) on rates and pathways of benthic mineralization in deposited mangrove shrimp pond waste. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 289, p.59-81, 2003.
- OTERO, X.L.; MACÍAS, F. Spatial variation in pyritization of trace metals in salt marsh soils. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 62, p. 59-86, 2003.
- ØVREÅS, L.; TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p 303–315, 1998.
- PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 9, p. 1-55, 1986.
- PRADA-GAMERO, R. M. **Mineralogia, físico-química e classificação dos solos de mangue do Rio Iriri no Canal de Bertioga (Santos, SP)**. 2001. 76p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.
- PURDY, K.J.; MUNOSON, M.A.; NEDWELL, D.B.; EMBLEY, T.M. Comparison of the molecular diversity of the methanogenic community at the brackish and marine ends of a UK estuary. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 39, p. 17-21, 2002.
- ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 25, p. 39-67, 2001.
- SAIT, L.; GALIC, M.; STRUGNELL, R.A.; JANSSEN, P.H. Secretory antibodies do not affect the composition of the bacterial microbiota in the terminal ileum of 10-week-old mice. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 2100-2109, 2003.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M. L. G.; DE-ROSA, T. Brazilian mangroves. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, Ontario, v. 3, p. 561-570, 2000.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing to DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SCHULZ, H.D. Redox Measurements in Marine Sediments. In: SCÜRING, J.; SHULZ, H.D.; FISCHER, W.R.; BÖTTCHER, J.; DUIJNISVELD, W.H.M. (Ed.). **Redox: Fundamentals processes and applications**. Berlin: Springer, 2000. Kap.19, p. 235-246.

SHERMAN, R.E.; FAHEY, T.J.; HOWARTH, R.W. Soil-plant interactions in a neotropical mangrove forest: iron, phosphorus and sulfur dynamics. **Oecologia**, Berlin, v. 115, p. 553-563, 1998.

SHRIADAH, M.M.A. Heavy metals in mangrove sediments of the United Arab Emirates shoreline (Arabian Gulf). **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 116, p. 523-534, 1999.

SINGLETON, D.R.; FURLONG, M.A.; RATHBUN, S.L.; WHITMAN, W.B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4374-4376, 2001.

SMITH, A.C.; KOSTKA, J.E.; DEVEREUX, R.; YATES, D.F. Seasonal composition and activity of sulfate-reducing prokaryotic communities in seagrass bed sediments. **Aquatic Microbial Ecology**, New York, v. 37, p.183-195, 2004.

SOUZA-JÚNIOR, V.S. **Mineralogia de solos e ambientes de sedimentação em manguezais do Estado de São Paulo**. 2006. 99p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SOUZA-SILVA, M.L.S. **Biogeoquímica de elementos traços em solos de sistemas estuarinos: manguezais do Estado de São Paulo (Brasil) e marismas da Galícia (Espanha)**. 2005. 158 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence-analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 44, p. 846-849, 1994.

SWOFFORD, D. L. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2003.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, p.240-245, 2002.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 78-87, 1990.

VALINSKY, L.; VEDOVA, G.D.; SCUPHAM, A.J.; ALVEY, S.; FIGUEROA, A.; YIN, B.; HARTIN, R.J.; CHROBAK, M.; CROWLEY, D.E.; JIANG, T.; BORNEMAN, J. Analysis of bacterial community composition by oligonucleotide fingerprinting of rDNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3243-3250, 2002.

VANNUCCI, M. **Os manguezais e nós: uma síntese de percepções**. São Paulo: EDUSP, 1999. 233p.

WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WOESE, C.R.; STACKEBRANDT, E.; MACKE, T.J.; FOX, G.E. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 6, p. 143-151, 1985.

WOODWELL, G.M.; WHITNEY, D.E.; HALL, C.A.S.; HOUGHTON, R.A.. The flax pond ecosystem study: Exchange of carbon in water between a salt marsh and Long island Sound. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 22, p. 833-838, 1977.

YOKOYA, N. S. Distribuição e origem. In: SCHAEFFER-NOVELLI, Y. (Ed.). **Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar**. São Paulo: Caribbean Ecological Research, 1995. cap.2, p. 9-12.

ZOPFI, J.; FERDELMAN, T.G.; JORGENSEN, B.B.; TESKE, A.; THAMDRUP, B. Influence of water column dynamics on sulfide oxidation and other major biogeochemical processes in the chemocline of Mariager Fjord (Denmark). **Marine Chemistry**, Amsterdam, v. 74, p. 29-51, 2001.

2 VARIAÇÕES DAS ESTRUTURAS DAS COMUNIDADES DE *BACTERIA* E *ARCHAEA* EM SOLOS DE MANGUE SOB DIFERENTES VEGETAÇÕES

Resumo

Variações das estruturas das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* em solos de mangue sob diferentes vegetações

Estudos de variação das estruturas das comunidades de procariotos em solos de mangue são escassos. No entanto, a vegetação de mangue, composta por espécies como *Spartina alterniflora*, *Rhizophora mangle*, *Avicennia schaueriana* e *Laguncularia racemosa*, pode ser um dos fatores que determinam a estruturação destas comunidades. O objetivo deste trabalho foi avaliar as variações das estruturas das comunidades de procariotos em solo superficial (0-10 cm) de mangue sob diferentes vegetações e em três épocas, utilizando DGGE de amplicons de rDNA 16S de *Bacteria* e *Archaea*. As comunidades de *Bacteria* apresentaram maior similaridade de estrutura entre as repetições do ponto amostrado do que entre os pontos sob diferentes condições de vegetação. As comunidades de *Bacteria* de solo com *S. alterniflora* apresentaram maior similaridade entre as repetições do que entre as épocas de amostragem. Com base nos resultados obtidos conclui-se que as estruturas das comunidades de procariotos apresentaram variações em função de condições de vegetação. Deve-se considerar também a influência de fatores edáficos e da variação temporal na determinação das estruturas das comunidades de procariotos. Comunidades de *Bacteria* e *Archaea* podem responder de maneira independente aos fatores que determinam as estruturas de suas comunidades.

Palavras-chave: mangue; solo; diversidade microbiana; microrganismos; *Bacteria*; *Archaea*; rDNA 16S, DGGE.

Abstract

Shifts in bacterial and archaeal community structures in mangrove soils under different vegetation

Information of the variation of prokaryotic community structures in mangrove soils is scarce. However, mangrove vegetation, composed of species like *Spartina alterniflora*, *Rhizophora mangle*, *Avicennia schaueriana* and *Laguncularia racemosa*, may be one of the factors that determine prokaryotic community structures in soils. The aim of this work was to evaluate the prokaryotic community structure variations in mangrove top soils (0-10 cm) under different vegetation and sampling time, using DGGE of bacterial and archaeal 16S rDNA amplicons. Bacterial community structures showed more similarity between repetitions samples than the areas under different vegetation. Bacterial communities of the soil under *S. alterniflora* showed more similarity between repetitions samples than the times of sampling. Based on the data obtained, it can be concluded that the vegetation is one of the factors affecting the structure of bacterial and archaeal communities in mangrove soils. Additionally, the effects of edaphic factors and seasonal variations have to be considered as determining the prokaryotic community structures, and bacterial and archaeal communities can respond independently to the factors that determine their community structures.

Keywords: mangrove; soil; microbial diversity; microorganisms; *Bacteria*; *Archaea*; rDNA 16S, DGGE.

2.1 Introdução

A composição das comunidades microbianas dos ambientes pode ser influenciada por inúmeros fatores bióticos e abióticos. Muitos trabalhos têm mostrado que as variações nas condições ambientais são, em parte, responsáveis pelas variações espaciais da diversidade de microrganismos, apesar de alguns estudos demonstrarem uma distribuição mais ubíqua (MARTINY et al., 2006). O solo, por ser um sistema complexo, que contém uma grande variedade de microhabitats, os quais são caracterizados por propriedades físicas, químicas e biológicas específicas, é um ambiente onde isto pode ocorrer em uma escala espacial relativamente reduzida. Fatores como materiais de origem, quantidade e qualidade da matéria orgânica presente, saturação com água, granulometria, características químicas e vegetação controlam a atividade, a diversidade e as estruturas das comunidades microbianas (SESSITSCH et al., 2001; AGNELLI et al., 2004).

Os solos de mangue são formados pela deposição de partículas orgânicas e inorgânicas de origem terrígena e marinha que se movimentam em função das correntes das marés, podendo apresentar características diferentes devido à variação na intensidade de geração e do transporte deste material (WOODHOUSE; SENECA; BROOME, 1974; VANNUCCI, 1999; STRALHER; STRALHER, 2000; PRADA-GAMERO, 2001). A vegetação do mangue, altamente especializada, adaptada ao solo periodicamente inundado e com grandes variações de salinidade (MACIEL, 1991), é dominada por espécies como *Spartina alterniflora*, *Rhizophora mangle*, *Avicennia schaueriana* e *Laguncularia racemosa* (ilustrações no Anexo). Essa vegetação pode representar um dos fatores que determinam as estruturas das comunidades microbianas nesse ambiente. Além disso, deve-se também considerar a variação temporal a que uma comunidade microbiana está sujeita devido a alterações de temperatura, aporte de matéria orgânica e disponibilidade de água e nutrientes. As características físico-químicas dos solos de mangue podem variar em função dos ciclos de marés, das variações climáticas e atividade de fauna e flora (FERREIRA, 2006).

Técnicas moleculares têm permitido estudos mais detalhados sobre a ecologia dos microrganismos em diferentes ambientes, antes limitados devido à utilização de técnicas baseadas em cultivo (TORSVIK et al., 1990). Várias delas têm sido utilizadas para a caracterização de comunidades microbianas dos solos (LAMBAIS et al., 2005). Com a utilização

do rDNA 16S e eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) tem-se avaliado as variações das estruturas das comunidades de procariotos em diversos ambientes (UITTERLINDEN, 1993; ØVREÅS et al., 1997; CURY, 2002; MUYZER; WAAL; PEDROSO et al., 2006). No entanto, estudos de microbiologia de solos de mangue são escassos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as variações das estruturas das comunidades de procariotos em sedimento e solos de mangue em função das variações de vegetação e temporais utilizando-se PCR-DGGE e sequenciamento de parte do rDNA 16S.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e métodos

2.2.1.1 Área de estudo e amostragem

As três áreas do estudo estão localizadas no complexo estuarino de Iguape e Cananéia, no litoral Sul do Estado de São Paulo (ilustrações no Anexo), consistindo nas florestas de mangue do Rio Ipaneminha (25°04'44''S e 47°56'14''W), Rio Sítio Grande (25°04'48''S e 47°56'54''W) e Ilha de Pai Matos (24°59'48''S e 47°54'19''W – ilustrações no Anexo). Nesta região a temperatura e precipitação média anual são de 21°C e 2.200 mm, respectivamente (SCHAEFFER-NOVELLI, 1982; SCHAEFFER-NOVELLI; MESQUITA; CINTRON-MOLERO, 1990). A amplitude média de maré é de 0,82 m (FERREIRA, 2006). As amostras foram coletadas no mangue do Rio Ipaneminha e Rio Sítio Grande em Abril de 2003 e as demais no mangue da Ilha de Pai Matos em Setembro de 2003, Março de 2004 e Setembro de 2004. Em um trabalho complementar foram realizadas determinações de potencial de oxi-redução (Eh), pH, granulometria e teor de C orgânico total, além da caracterização das variações dos processos geoquímicos envolvendo o Fe e o S (FERREIRA, 2006).

As amostras foram transferidas até o laboratório a 4°C e mantidas a -80°C em tubos de polietileno de 15 mL até o processamento para a extração do DNA.

2.2.1.1.2 Amostras utilizadas na comparação de diferentes condições de vegetação

Em Setembro de 2003 foram coletadas amostras, em duplicata, dentro de um quadrante de 1 m², da camada superficial do solo (0-10 cm) do mangue do rio Ipaneminha (ilustrações no Anexo) sob os seguintes tipos de vegetação: mangue dominado por *Rhizophora mangle* (R); mangue misto, dominado por *Rhizophora mangle* e *Avicennia schaueriana* (M); transição entre mangue misto e área de restinga (T), onde se encontra vegetação estabelecida de mata atlântica, sendo que a amostragem foi feita em solo típico de mangue (ponto adjacente e altimetricamente inferior à área de restinga); área da borda do manguezal (S), dominada por *Spartina alterniflora*. Também foi amostrado o sedimento do leito de um canal (L) adjacente ao ponto de amostragem dominado por *Rhizophora mangle* (R) e solo de um compartimento dominado por *Rhizophora mangle* da floresta do Rio Sítio Grande (R2). No momento da amostragem foram medidos pH e Eh do solo (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Valores de pH e Eh da camada superficial (0-10 cm) de sedimento de leito de canal (L) e de solo de mangue com vegetação de *Rhizophora mangle* (R), mista de *Rhizophora mangle* e *Avicennia schaueriana* (M), transição entre mangue e restinga (T) e *Spartina alterniflora* (S) do mangue do Rio Ipaneminha e solo com *Rhizophora mangle* (R2) do mangue do Rio Sítio Grande

Amostra	pH	Eh (mV)
R	6,5	-61
M	6,8	-123
T	6,5	-44
S	6,8	8
R2	6,0	100
L	7,2	-138

2.2.1.1.3 Amostras utilizadas na comparação da variação temporal das estruturas das comunidades de procariotos de sedimento sem vegetação e solo com *Spartina alterniflora*

Foram utilizadas amostras da camada superficial (0-10 cm) do sedimento sem vegetação e solo com *S. alterniflora*, distando cerca de 3 m, da entrada do mangue da Ilha de Pai Matos

(ilustrações no Anexo) coletadas em duplicata, dentro de um quadrante de 1 m², em Setembro de 2003 (C1), Março de 2004 (C2) e Setembro de 2004 (C3).

2.2.1.2 Extração do DNA

Para a extração do DNA do solo, utilizou-se o kit FastDNA Spin for Soil (MP Biomedicals). Em microtubos contendo granada finamente moída, foi adicionado cerca de 0,6 g de solo, 978 µL de tampão fosfato e 122 µL de tampão MT. Estes tubos foram agitados horizontalmente a 4 ms⁻¹ por 30 segundos no FP120 FastPrep Cell Disruptor (MP Biomedicals). Em seguida centrifugou-se por 1 minuto a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo. A essa solução adicionaram-se 250 µL de tampão PPS, agitando-se os tubos 10 vezes por inversão. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante coletado e transferido para um microtubo limpo. Adicionou-se 1 mL de matriz de ligação, agitando-se os tubos durante 2 minutos por inversão. Em seguida os tubos foram incubados por 3 minutos, a matriz de ligação foi transferida para um filtro acoplado a um microtubo (Spin Filter – MP Biomedicals) e os tubos centrifugados por 2 minutos a 13.000 rpm. A matriz de ligação retida no filtro foi lavada com 500 µL de uma solução de lavagem (SEWS), e o filtro centrifugado 2 vezes por 2 minutos a 13.000 rpm. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 50 µL de água ultrapura ao filtro e centrifugou-se por 2 minutos a 13.000 rpm. O DNA purificado foi recolhido em um tubo limpo e sua quantificação feita por comparação com padrão de massa, após eletroforese em gel de agarose 1,5% - 0,5x TBE (1x TBE: 44 mM de Tris-borato e 1 mM de EDTA pH 8,0), utilizando-se um densitômetro laser FluorImagem (Amershan Biosciences) e o programa Fragment Analysis (Amershan Biosciences). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa DNA Mass Ladder (Invitrogen).

2.2.1.3 PCR-DGGE

Para a amplificação do rDNA 16S de *Bacteria* utilizaram-se os iniciadores BA338fGC (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA G 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREÅS et al., 1997). A

amplificação foi feita em solução contendo: 2,5 µL de tampão para PCR 10x; 0,2 mM de dNTP; 3,0 mM de MgCl₂; 1 unidade de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen); 1 µL da amostra de DNA; 5 pmol de cada primer; água Milli-Q esterilizada para um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf), nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de 92°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; 72°C por 10 minutos. A quantificação dos amplicons resultantes foi feita por densitometria, após eletroforese em gel de agarose 1,5% (TBE 0,5x – gel e tampão de corrida), utilizando-se um densitômetro laser FluorImager (Amershan Biosciences) e o programa Fragment Analysis (Amershan Biosciences). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa DNA Mass Ladder (Invitrogen). Para a amplificação inicial do rDNA 16S de *Archaea* utilizaram-se os iniciadores ARCH21f (5' TTC YGG TTG ATC CYG CCI GA 3') e ARCH958r (5' YCC GGC GTT GA(I/C) TCC AAT T 3') (MOYER et al., 1998). Os amplicons resultantes foram utilizados como molde para uma nova amplificação com os iniciadores ARCH340fGC (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC CTA CGG GGY GCA SCA G 3') e ARCH519r (5' TTA CCG CGG CKG CTG 3') (ØVREÅS et al., 1997). As amplificações foram feitas em solução contendo as mesmas proporções de reagentes como descrito para *Bacteria*. A reação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf), nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; 72°C por 6 minutos. A quantificação dos amplicons resultantes foi feita como descrito acima para *Bacteria*.

Os amplicons do rDNA 16S foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE). Os géis de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1, m:m) 8%, foram preparados com gradiente desnaturante variando de 15% a 55%, usando duas soluções: uma solução desnaturante 100%, contendo 7 M de uréia e 40% de formamida e uma solução 0%, sem uréia e formamida (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi feita a 60°C e 200 v constantes, por 3 horas, em um sistema vertical DCode (BioRad), utilizando solução tampão 0,5x de TAE (10 mM de Tris-acetato e 0,5 mM de EDTA pH 8,0). Após a eletroforese, o gel foi imerso em uma solução 10% de ácido acético glacial por 15 minutos em agitador horizontal. Em seguida o gel foi lavado três vezes com água destilada, imerso em solução de metanol 50% por 15 minutos em agitador horizontal, lavado três vezes com água destilada e imerso em solução de SYBR-Green I (Molecular Probes) (1:10.000, v:v) por 30 minutos em agitador horizontal no

escuro. Após a coloração, o gel foi analisado por densitometria, utilizando-se o densitômetro laser FluorImager e o programa Fragment Analysis (Amershan Biosciences).

A similaridade entre as estruturas de comunidades de *Bacteria* e *Archaea* foi determinada com base na presença ou ausência das bandas detectadas no gel com a utilização do programa Diversity Database (BioRad). A análise de agrupamento hierárquico foi feita com o programa Systat 8.0, utilizando-se matrizes de similaridade geradas pelo método de concordância simples (“simple matching”), algoritmo de Ward e a distância euclidiana como unidade de medida.

2.2.2 Resultados

2.2.2.1 Comparação de diferentes condições de vegetação

A análise de agrupamento hierárquico dos amplicons de rDNA 16S de *Bacteria* a partir de DGGE mostra que as repetições das amostras analisadas encontram-se dispostas em pares (Figura 2.1), indicando maior similaridade das comunidades microbianas entre as repetições do mesmo ponto de amostragem. Esses resultados indicam que as variações das estruturas das comunidades de procariotos entre os pontos estudados são maiores do que entre as repetições. Considerando a média das duas repetições utilizadas na comparação anterior, pode-se observar no novo agrupamento hierárquico (Figura 2.2) que a estrutura da comunidade de *Bacteria* do mangue de *R. mangle* do Rio Sítio Grande (R2) apresenta maior distância em relação aos solos do mangue do Rio Ipaneminha. A Figura 2.2 também mostra maior similaridade entre as comunidades dos solos com vegetação heterogênea (M e T).

A análise de agrupamento hierárquico dos amplicons de rDNA 16S de *Archaea* a partir de DGGE (Figura 2.3) também indicam maior similaridade das comunidades microbianas entre as repetições do mesmo ponto de amostragem, neste caso utilizadas apenas para o solo com *S. alterniflora*. Considerando apenas uma das repetições utilizadas na comparação acima, pode-se observar no novo agrupamento hierárquico (Figura 2.4) dois agrupamentos principais com L, S e R e com R2, M e T. Ao contrário do que ocorreu para *Bacteria* (Figura 2.2), a estrutura da comunidade de *Archaea* do mangue de *R. mangle* do Rio Sítio Grande (R2) não apresenta maior distanciamento em relação aos solos do mangue do Rio Ipaneminha (Figura 2.4). Assim como

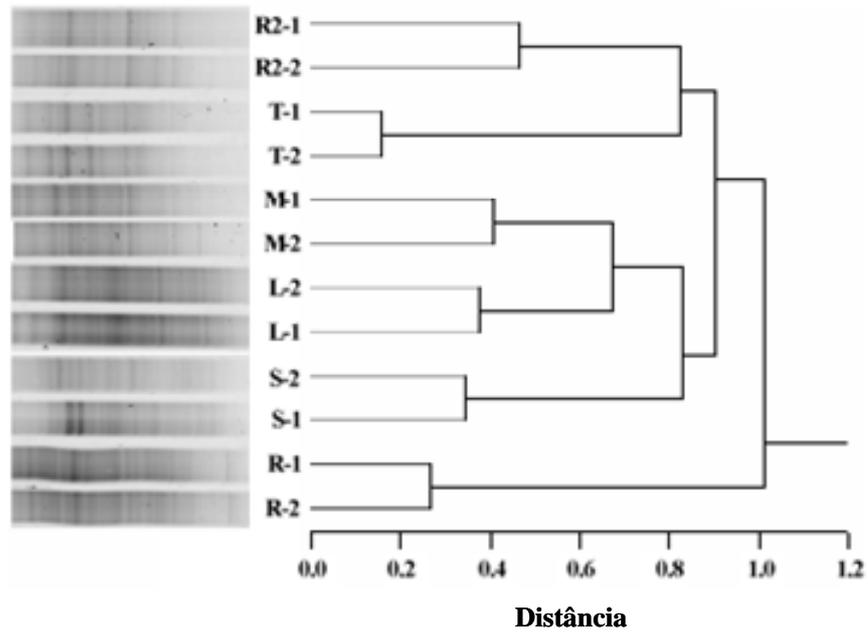


Figura 2.1 – Agrupamento hierárquico com base na separação de amplicons de rDNA 16S de *Bacteria* por DGGE. As amostras foram coletadas na camada superficial (0-10 cm) de sedimento de leito de canal (L-1, L-2) e de solo de mangue do Rio Ipaneminha com vegetação de *Rhizophora mangle* (R-1, R-2), *Rhizophora mangle* e *Avicennia schaueriana* (M-1, M-2), transição entre mangue e restinga (T-1, T-2) e *Spartina alterniflora* (S-1, S-2) e solo de mangue do Rio Sítio com *Rhizophora mangle* (R2-1, R2-2). O número antecedido de hífen representa a repetição da amostragem utilizada na análise

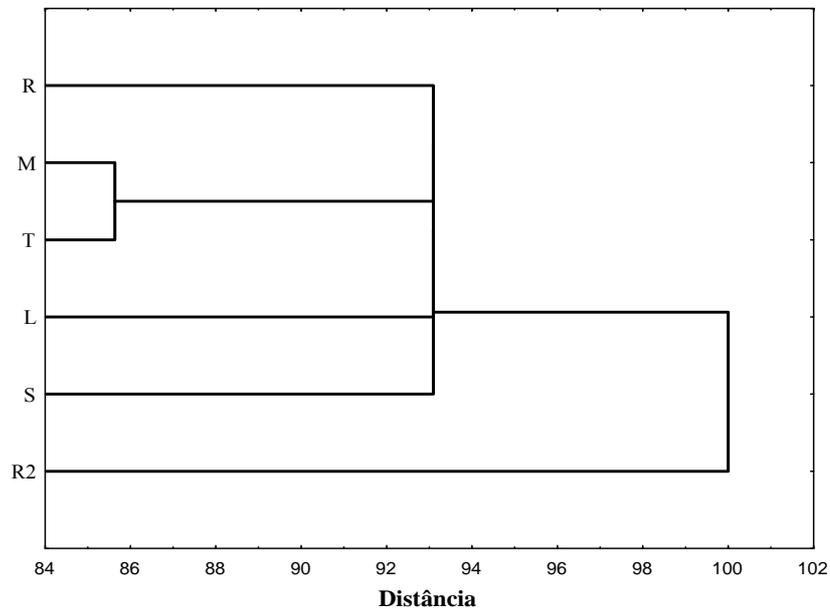


Figura 2.2 – Agrupamento hierárquico com base na separação de amplicons de rDNA 16S de *Bacteria* por DGGE. As amostras foram coletadas na camada superficial (0-10 cm) de sedimento de leito de canal (L) e de solo de mangue do Rio Ipaneminha com vegetação de *Rhizophora mangle* (R), *Rhizophora mangle* e *Avicennia schaueriana* (M), transição entre mangue e restinga (T) e *Spartina alterniflora* (S) e solo de mangue do Rio Sítio com *Rhizophora mangle* (R2)

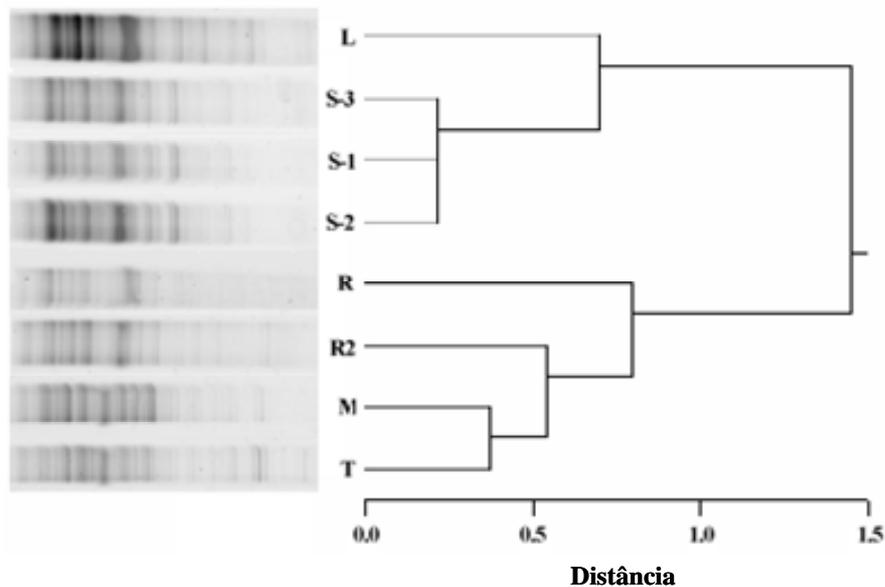


Figura 2.3 – Agrupamento hierárquico com base na separação de amplicons de rDNA 16S de *Archaea* por DGGE. As amostras foram coletadas na camada superficial (0-10 cm) de sedimento de leito de canal (L) e de solo de mangue do Rio Ipaneminha com vegetação de *Rhizophora mangle* (R), *Rhizophora mangle* e *Avicennia schaueriana* (M), transição entre mangue e restinga (T) e *Spartina alterniflora* (S) e solo de mangue do Rio Sítio com *Rhizophora mangle* (R). O número antecedido de hífen representa a repetição da amostragem utilizada na análise

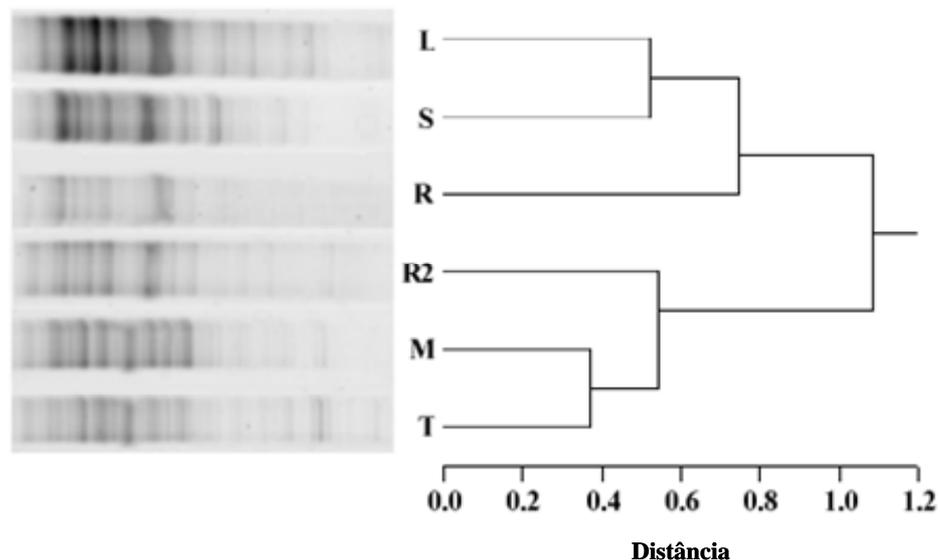


Figura 2.4 – Agrupamento hierárquico com base na separação de amplicons de rDNA 16S de *Archaea* por DGGE. As amostras foram coletadas na camada superficial (0-10 cm) de sedimento de leito de canal (L) e de solo de mangue do Rio Ipaneminha com vegetação de *Rhizophora mangle* (R), *Rhizophora mangle* e *Avicennia schaueriana* (M), transição entre mangue e restinga (T) e *Spartina alterniflora* (S) e solo de mangue do Rio Sítio com *Rhizophora mangle* (R)

ocorreu para *Bacteria* (Figura 2.2), a maior similaridade é encontrada entre as comunidades dos solos com vegetação heterogênea (M e T – Figura 2.4).

2.2.2.2 Comparação da variação temporal das estruturas das comunidades de procariotos de sedimento sem vegetação e solo com *Spartina alterniflora*

A análise de agrupamento hierárquico a partir do DGGE de amplicons de rDNA 16S de *Archaea* não mostra uma separação das repetições das amostras coletadas na mesma época em pares de maior similaridade (Figuras 2.5a, 2.5b e 2.5c), indicando que as estruturas das comunidades de microrganismos deste domínio não sofreram alterações sazonais significativas. Quando a mesma análise é feita agrupando-se as amostras nas mesmas épocas de coleta (Figuras 2.5d, 2.5e e 2.5f), verifica-se que existe separação entre as comunidades de *Archaea* das duas situações apenas na época C3 (Figura 2.5f), mostrando que apenas nessa época parece haver influência da presença de *S. alterniflora* na determinação da estrutura das comunidades de *Archaea*. A análise de agrupamento hierárquico a partir do DGGE de amplicons de rDNA 16S de *Bacteria* mostrou que alterações temporais ocorrem no solo com *S. alterniflora* (SP), já que houve separação das repetições das amostras coletadas na mesma época em pares de maior similaridade (Figura 2.6b), não ocorrendo o mesmo no sedimento sem vegetação (Figura 2.6c). Quando a análise é feita agrupando-se as amostras nas mesmas épocas de coleta (Figuras 2.6d, 2.6e e 2.6f), verifica-se que existe separação entre as comunidades de *Bacteria* das duas situações nas três épocas de coleta, mostrando que a influência da presença de *S. alterniflora* na determinação da estrutura das comunidades de *Bacteria* pode estar ocorrendo durante todo o período.

2.2.3 Discussão

Os solos possuem características físico-químicas específicas, determinadas por fatores como materiais de origem, quantidade e qualidade da matéria orgânica e granulometria. Estas características, juntamente com a atividade biológica das espécies vegetais, podem controlar a composição e a atividade das comunidades microbianas, determinando suas condições de sobrevivência e crescimento (SESSITSCH et al., 2001; AGNELLI et al., 2004). Porém, a

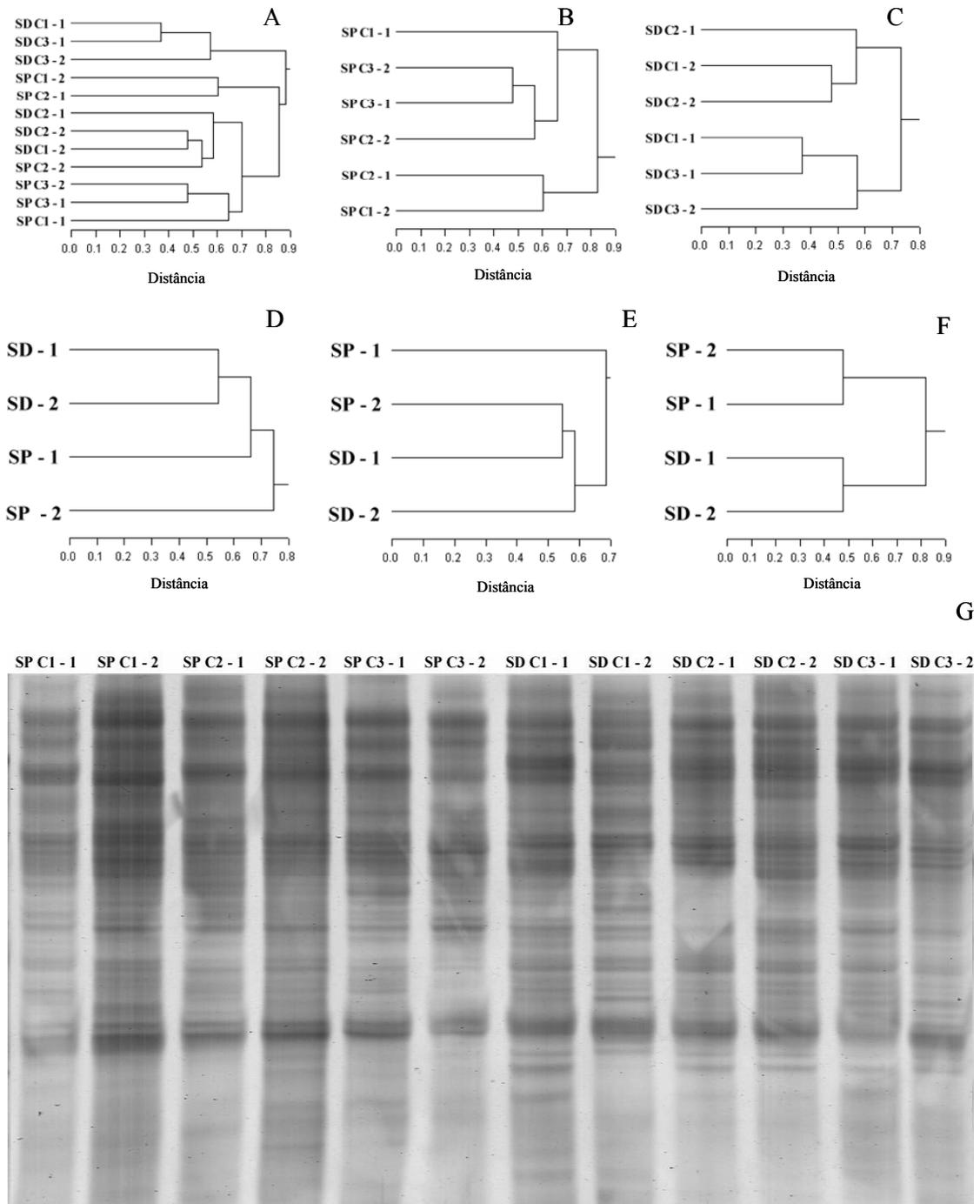


Figura 2.5 – Agrupamentos hierárquicos com base na separação de amplicons de rDNA 16S de *Archaea* por DGGE (G). As amostras foram coletadas na camada superficial (0-10 cm) de sedimento sem vegetação (SD) e solo de mangue com *Spartina alterniflora* (SP) em três épocas: Setembro de 2003 (C1), Março de 2004 (C2) e Setembro de 2004 (C3). As análises de agrupamento hierárquico foram realizadas com todas as amostras (A) e separando-as em função da presença (B) ou ausência (C) de *S. alterniflora* e em função das épocas de coleta C1 (D), C2 (E) e C3 (F). O número precedido de hífen representa a repetição utilizada na análise

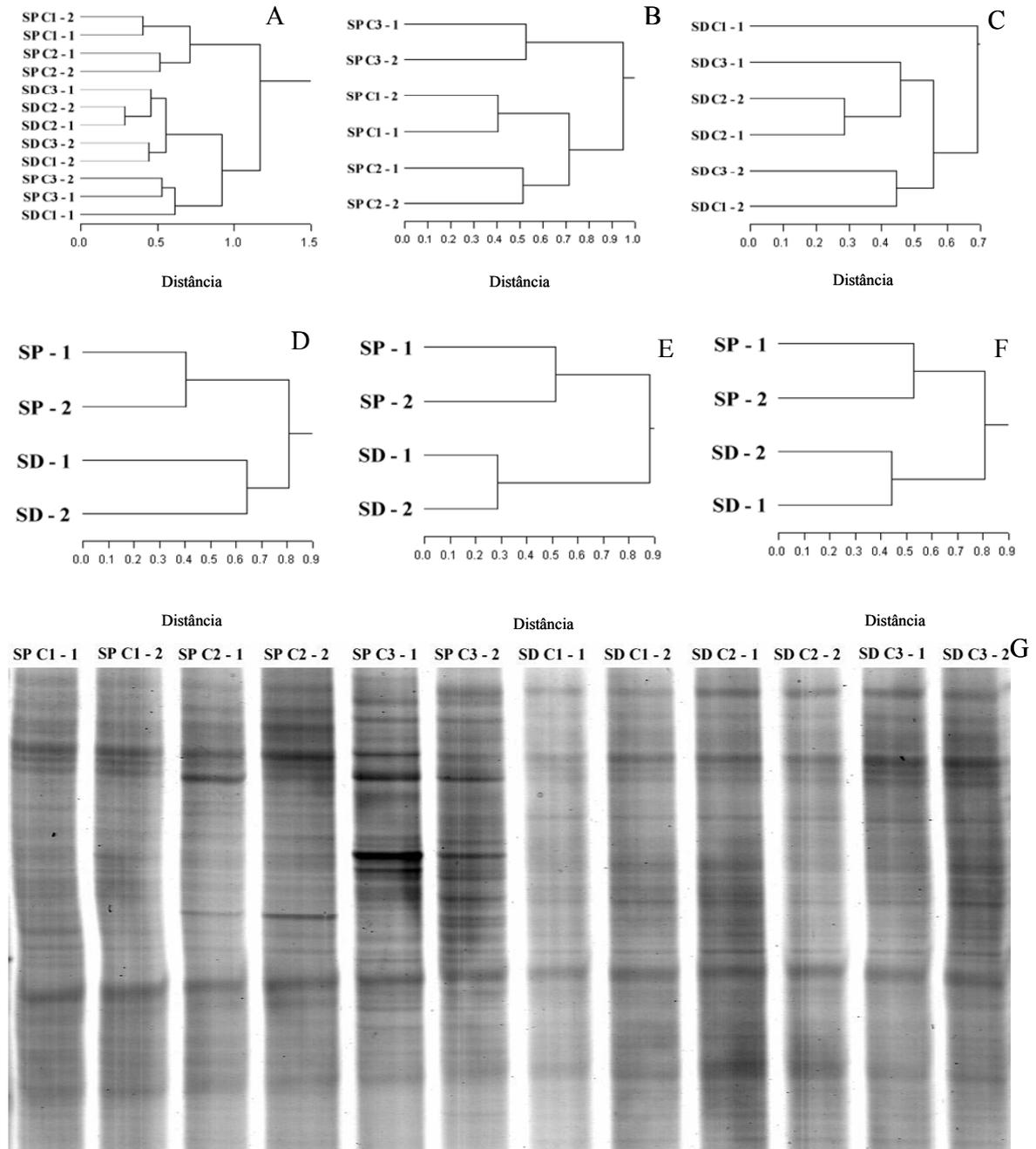


Figura 2.6 – Agrupamentos hierárquicos com base na separação de amplicons de rDNA 16S de *Bacteria* por DGGE (G). As amostras foram coletadas na camada superficial (0-10 cm) de sedimento sem vegetação (SD) e solo de mangue com *Spartina alterniflora* (SP) em três épocas: Setembro de 2003 (C1), Março de 2004 (C2) e Setembro de 2004 (C3). As análises de agrupamento hierárquico foram realizadas com todas as amostras (A) e separando-as em função da presença (B) ou ausência (C) de *S. alterniflora* e em função das épocas de coleta C1 (D), C2 (E) e C3 (F). O número precedido de hífen representa a repetição utilizada na análise

heterogeneidade desses atributos pode ser elevada em escala espacial relativamente reduzida (SEXSTONE et al., 1985), principalmente devido a fatores como acúmulo diferencial de material orgânico particulado (PARKIN, 1987; VanNOORWIJK et al., 1993; PETERSEN et al., 1996), excreção de substâncias por animais (PETERSEN et al., 1996) e exudação das raízes (JOERGENSEN, 2000; PINTON; VARANINI; NANNIPIERI, 2001). Isto possibilita o surgimento de microssítios com características edáficas e microbiológicas específicas. Tiedje et al. (2001) sugerem que a competição entre as comunidades microbianas da superfície do solo é limitada pelo relativo isolamento espacial dos microssítios. A conectividade entre microssítios ocorre durante períodos muito curtos de tempo, imediatamente após a chuva, quando a água faz o papel de ponte entre os agregados de solo. Para Torsvik et al. (2002), estas variações são as responsáveis pela dificuldade na definição de amostras representativas das comunidades microbianas dos solos. Porém, estas hipóteses baseiam-se em estudos realizados em solos não saturados. Em solos de mangue, que sofrem inundações frequentes, a conectividade entre os microssítios é maior, resultando em maior homogeneidade das estruturas das comunidades microbianas. Os resultados apresentados nas Figuras 2.1 e 2.2 mostram esta tendência, indicando maior similaridade das comunidades de procariotos entre as repetições dos pontos de amostragem nas áreas de 1 m² do que entre os pontos de amostragem.

O estabelecimento da vegetação no sedimento de mangue pode ser um fator biótico importante na determinação da estrutura da comunidade microbiana. Utilizando as mesmas amostras de Setembro de 2003 utilizadas neste estudo, Ferreira (2006) observou considerável variação de valores de pH e Eh entre as subamostras superficiais (5 cm) do sedimento sem vegetação (SD – pH ≈ 6,9; Eh ≈ 70 mV) e solo com *S. alterniflora* (SP – pH ≈ 5,2; Eh ≈ 370 mV), distantes cerca de 3 m, indicando maior atividade oxidativa com a presença da vegetação. As plantas podem causar variações de potencial de oxi-redução nos solos por serem capazes de translocar oxigênio para a subsuperfície através das raízes, oxidando seu entorno (McKEE et al., 1988; McKEE, 1993; CLARK et al., 1998; MARCHAND et al., 2004), e este processo varia com a espécie vegetal (GLEASON; EWEL; HUE, 2003). Estudos com *Spartina* demonstram que as propriedades físico-químicas do solo podem ser afetadas devido à condução de O₂ para a subsuperfície (VALE et al., 1990; MADUREIRA; VALE; SIMÕES-GOLÇALVES, 1997; SUNDBY, et al., 1998; SUNDBY et al., 1998). Íons Fe²⁺ livres e provenientes da oxidação da pirita se concentram na porção superficial do solo devido ao fluxo gerado pela evapotranspiração

e, ao encontrarem condições mais oxidantes, precipitam como oxidróxidos (CLARK et al., 1998), o que foi demonstrado pelas maiores quantidades destas espécies de ferro na camada superficial do solo (0-25 cm) com *S. alterniflora* ($\sim 252 \mu\text{molg}^{-1}$) comparado ao sedimento sem vegetação ($\sim 63 \mu\text{molg}^{-1}$) (FERREIRA, 2006). Outra evidência de alteração geoquímica é a maior quantidade de Fe-pirítico e grau de piritização no solo vegetado (FERREIRA, 2006). Isto pode estar ligado a um possível estímulo da redução bacteriana do sulfato pelos exudatos das raízes e pela formação de espécies de enxofre parcialmente oxidadas devido ao Eh mais elevado, permitindo a síntese da pirita (RICKARD, 1975; GIBLIN; HOWARTH, 1984; GIBLIN, 1988; ALONGI et al., 2001). Já o menor valor de pH no solo com *S. alterniflora* pode estar associado à oxidação da pirita (FERREIRA, 2006).

Apesar de ser considerado um dos principais fatores capazes de alterar as condições biogeoquímicas dos solos dos ecossistemas estuarinos (SHERMAN; FAHEY; HOWARTH, 1998; KRISTENSEN et al., 2000; GLEASON; EWEL; HUE, 2003; NIELSEN; KRISTENSEN; MACINTOSH, 2003; MARCHAND et al., 2004), a vegetação não deve ser considerada a única responsável pela definição das diferentes estruturas das comunidades de procariotos encontradas nos solos de mangue analisados. Como mostrado nas Figuras 2.2 e 2.4, as estruturas das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* do solo com *R. mangle* do mangue do Rio Ipaneminha apresentam baixa similaridade com aquelas do mangue do Rio Sítio Grande sob *R. mangle*, indicando que, além da vegetação, outros fatores são determinantes para a definição das comunidades de procariotos. Apesar dos dois compartimentos serem dominados pela mesma espécie vegetal, estes apresentam variações de potencial de oxi-redução (anóxico no mangue do Rio Ipaneminha e subóxico-anóxica no mangue do Rio Sítio Grande - Tabela 2.1). Segundo Ferreira (2006), estes solos também apresentam diferenças de granulometria, sendo mais arenoso no mangue do Rio Sítio Grande (85% de areia) do que no mangue do Rio Ipaneminha (15% de areia), além de diferenças nos teores de C total que foi de 1,8% e 8,8%, respectivamente. Além disso, também foram observadas diferenças relacionadas aos processos biogeoquímicos que envolvem as reações de formas de ferro e enxofre reduzidas pela ação de bactérias no ambiente anóxico. Segundo o autor, os valores significativamente maiores de HS^- e menores de Fe pirítico no solo do Rio Sítio Grande são um reflexo da limitação de fontes de Fe reativo nestes solos, que pode ser explicada pelo domínio da fração areia.

No estudo de caracterização de atributos do solo de mangue da Ilha de Pai Matos sob diferentes condições de vegetação e sua variação temporal, Ferreira (2006) observou pequenas alterações nos valores de pH da água intersticial da camada superficial (0-10 cm) do sedimento (~7,4 em C2 e ~7,7 em C3) e do solo com *S. alterniflora* (~7,0 em C2 e ~7,4 em C3). Outros atributos, que podem também influenciar ou refletir alterações nas populações microbianas, mostraram variação temporal. Maiores valores de grau de piritização e concentrações de Fe pirítico e da fração AVS (sulfetos voláteis em meio ácido) foram encontrados em Setembro de 2004 (C3) quando comparadas com as de Março de 2004 tanto no sedimento sem vegetação (SD) como no solo com *S. alterniflora* (SP). Durante a sulfato-redução realizada pelas bactérias, além da síntese da pirita (FeS_2), pode ocorrer a precipitação de outros sulfetos de ferro pouco estáveis, como a greigita (Fe_3S_4) e a mackinawita (FeS), constituintes da fração AVS (HOWARTH; MERKEL, 1984; BREEMEN; BUURMAN, 1998; FERREIRA, 2006). Para Ferreira (2006), as menores concentrações de Fe pirítico e da fração AVS no solo com *S. alterniflora* (SP) em Março de 2004 (verão) são explicadas pela maior atividade da vegetação e conseqüente aumento da oxidação destes minerais. Já as menores concentrações no sedimento sem vegetação (SD) na mesma época podem ser explicadas pela maior atividade de macrofauna (caranguejos), aumentando a difusão de O_2 . Estes dados, referentes a um dos processos biogeoquímicos que ocorrem nos solos de mangue, podem indicar variações na atividade dos microrganismos envolvidos com os processos de sulfato-redução e formação de minerais da fração AVS e pirita, mas não podem ser associadas às variações temporais encontradas nas estruturas de comunidades de *Bacteria*.

As análises de comparação das estruturas das comunidades de procariotos em sedimento sem vegetação e solo com *S. alterniflora* indicam que a comunidade de *Bacteria* pode ser mais susceptível às alterações causadas por fatores ligados à variação temporal e à presença da vegetação do que a comunidade de *Archaea*. Considerando também a comparação dos diferentes compartimentos do mangue do Rio Ipaneminha (Figuras 2.2 e 2.4), as alterações nas estruturas das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* são independentes. Em trabalho anterior, com solo de mangue contaminado com petróleo, observou-se que as variações das estruturas das comunidades de *Bacteria* estavam mais relacionadas aos diferentes níveis de contaminação, enquanto que para *Archaea* o fator determinante para as estruturas das comunidades foi o de profundidade de coleta (CURY, 2002).

2.3 Conclusões

As estruturas das comunidades de *Archaea* e *Bacteria* do sedimento e solos de mangue estudados apresentam variações espaciais e temporais que podem estar associadas a variações de características edáficas e de vegetação.

As estruturas das comunidades de *Bacteria* do sedimento de mangue se mostraram mais susceptíveis a alterações devido à presença de *S. alterniflora* do que as estruturas das comunidades de *Archaea*.

Alterações temporais mais pronunciadas foram observadas para as estruturas das comunidades de *Bacteria* no solo com *S. alterniflora*, quando comparado com sedimento sem vegetação, ou comunidades de *Archaea* nestas duas situações.

Referências

AGNELLI, A.; ASCHER, J.; CORTI, G.; CECCHERINI, M.T.; NANNIPIERI, P.; PIETRAMELLARA, G. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 859-868, 2004.

ALONGI, D.M.; TIRENDI, F.; CLOUGH, B.F. Below-ground decomposition of organic matter in forests of mangroves *Rhizophora stylosa* and *Avicennia marina* along the arid coast of Western Australia. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 68, p. 97-122, 2000.

ALONGI, D.M.; WATTAYAKORN, G.; PFITZNER, J.; TIRENDI, F.; ZAGORSKIS, I.; BRUNSKILL, G.J.; DAVIDSON, A.; CLOUGH, B.F. Organic carbon accumulation and metabolic pathways in sediments of mangrove forests in southern Thailand. **Marine Geology**, Amsterdam, v. 179, p. 85-103, 2001.

BREEMEN, N.V.; BUURMAN, P. **Soil formation**. Dordrecht: Kluwer, 1998. 376 p.

CLARK, M.W.; MCCONCHIE, D.; LEWIS, D.W.; SAENGER, P. Redox stratification and heavy metal partitioning in *Avicennia*-dominated mangrove sediments: a geochemical model. **Chemical Geology**, Amsterdam, v. 149, p. 147-171, 1998.

CURY, J.C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solos de mangue contaminado com petróleo**. 2002. 84p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2002.

- FERREIRA, T.O. **Processos pedogenéticos e biogeoquímica de Fe e S em solos de manguezais**. 2006. 141 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- GIBLIN, A. Pyrite formation in marshes during early diagenesis. **Journal of Geomicrobiology**, Bristol, v. 6, p.77-97, 1988.
- GIBLIN, L.; HOWARTH, R.W. Porewater evidence for a dynamic sedimentary iron cycle in salt marshes. **Limnology and Oceanography**, Baltimore, v. 29, p. 47-63, 1984.
- GLEASON, S.M.; EWEL, K.C.; HUE, N. Soil redox conditions and plant-soil relationships in a micronesian mangrove forest. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, London, v. 56, p. 1065-1074, 2003.
- HOWARTH R.W.; MERKEL S. Pyrite formation and the measurement of sulfate reduction in salt marsh sediments. **Limnology Oceanography**, Baltimore, v. 29, p. 598-608, 1984.
- JOERGENSEN, R.G. Ergosterol and microbial biomass in the rhizosphere of grassland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 647-652, 2000.
- KRISTENSEN, E.; ANDERSEN, F.O.; HOLMBOE, N.; HOLMER, M.; THONGTHAM, N. Carbon and nitrogen mineralization in sediments of the Bangrong mangrove area, Phuket, Thailand. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf Luhe, v. 22, p. 199–213, 2000.
- LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos Paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L. R. F.; COOPER, M.; SILVA, A. P.; CARDOSO, E. J.. (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 43-84.
- MADUREIRA, M.J.; VALE, C.; SIMÕES-GONÇALVES, M.L. Effect of plants on sulphur geochemistry in Tagus salt-marshes sediments. **Marine Chemistry**, Amsterdam, v. 58, p. 27-37, 1997.
- MARCHAND, C.; BALTZER, F.; LALLIER-VERGÈS, E.; ALBÉRIC, P. Pore-water chemistry in mangrove sediments: Relationship with species composition and developmental stages (French Guiana) **Marine Geology**, Amsterdam, v. 208, p. 361–381, 2004.
- MARTINY, J.B.H.; BOHANNAN, B.J.M; BROWN, J.H.; COLWELL, R.K.; FUHRMAN, J.A.; GREEN, J.L.; HORNER-DEVINE, M.C.; KANE, M.; KRUMINS, J.A.; KUSKE, C.R.; MORIN, P.J.; NAEEM, S.; ØVREÅS, L.; REYSENBACH, A.; SMITH, V.H.; STALEY, T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature**, London, v. 4, p. 102-112, 2006.
- MCKEE, K.L. Soil physicochemical patterns and mangrove species distribution-reciprocal effects? **The Journal of Ecology**, Oxford, v. 81, p. 477-487, 1993.

- MCKEE, K.L.; MENDELSSOHN, I.A.; HESTER, M.W. Reexamination of pore water sulfide concentrations and redox potentials near the aerial roots of *Rhizophora mangle* and *Avicennia germinans*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 75, p. 1352-1359, 1988.
- MOYER, C.L.; TIEDJE, J.M.; DOBBS, F.C.; KARL, D.M. Diversity of deep-sea hydrothermal vent *Archaea* from Loihi Seamount, Hawaii. **Deep-sea Research**, Oxford, v. 45, p. 303-317, 1998.
- MUYZER, G.; WAAL, E.C. de; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rDNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p.695-700, 1993.
- NIELSEN, O.I.; KRISTENSEN, E.; MACINTOSH, D.J. Impact of fiddler crabs (*Uca* spp.) on rates and pathways of benthic mineralization in deposited mangrove shrimp pond waste. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 289, p.59-81, 2003.
- ØVREÅS, L; FORNEY, L.; DAAE, F.L. TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1997.
- PARKIN, T.B. Soil microsites as a source of denitrification variability. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 51, p. 1194-1199, 1987.
- PEDROSO, A.A; MENTEN, J.F.M.; LAMBAIS, M.R.; RACANICCI, A.M.C.; LONGO, F.A.; SORBARA, O.B. Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. **Poultry Science**, Savoy, v. 85, p. 747-752, 2006.
- PETERSEN, S.O.; NIELSEN, T.H.; FROSTEGARD, A.; OLESEN, T. O₂ uptake, C metabolism and denitrification associated with manure hot-spots. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 341-349, 1996.
- PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. **The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface**. New York : Marcel Dekker, 2001.
- RICKARD, D. Kinetics and mechanism of pyrite formation at low temperatures. **American Journal of Science**, New Haven, v. 275, p. 636-652, 1975.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Os Manguezais de Cananéia (25°S, Brasil). II - Um projeto integrado para avaliação do Ecossistema/Estrutura. **Revista Atlântica**, Rio Grande, v. 2, n. 5, p. 108, 1982.
- SHAEFFER-NOVELLI, Y.; MESQUITA, H. S. L.; CINTRON-MOLERO, G. The Cananéia lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil. **Estuaries**, Columbia, v. 13, p. 193-203, 1990.

- SHERMAN, R.E.; FAHEY, T.J.; HOWARTH, R.W. Soil-plant interactions in a neotropical mangrove forest: iron, phosphorus and sulfur dynamics. **Oecologia**, Berlin, v. 115, p. 553-563, 1998.
- SESSITSCH, A; WEILHARTER, A.; GERZABEK, M.H.; KIRCHMANN, H.; KANDELER, E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p.4215-4224, 2001.
- SEXSTONE, A.J.; REVSBECH, N.P.; PARKIN, T.B.; TIEDJE, J.M. Direct measurement of oxygen profiles and denitrification rates in soil aggregates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 49, p. 645-651, 1985.
- STRALHER, A.N.; STRALHER, A.H. **Geografia física**. 3.ed. Barcelona: Omega, 2000. 550p.
- SUNDBY, B.; VALE, C.; CAÇADOR, I.; CATARINO, F.; MADUREIRA, M.J.; CAETANO, M.. Metal-rich concretions on the roots of salt marsh plants: mechanism and rate formation. **Limnology and Oceanography**, Baltimore, v. 43, p. 245-252, 1998.
- TIEDJE, J.M.; CHO, J.C.; MURRAY, A.; TREVES, D.; XIA B.; ZHOU, J. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: REES, R.M.; BALL, B.C.; CAMPBELL, C.D.; WATSON C.A. (Ed.). **Sustainable Management of Soil Organic Matter**. London:CAB International, 2001. chap. 6, p. 393-412.
- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 78-87, 1990.
- TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T.F. Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, Washington, v. 296, p. 1064-1066, 2002.
- VALE, C.; CATARINO, F.M.; CORTESÃO, C.; CAÇADOR, M.I. Presence of metal- rich rhizoconcretions on the roots of *Spartina maritima* from the salt marshes of the Tagus estuary, Portugal. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 97, p. 617-626, 1990.
- Van NOORWIJK, M.; de RUITER, P.C.; ZWART, K.B.; BLOEM, J.; MOORE, J.C.; van FAASSEN, H.G.; BURGERS, S.L.G.E. Synlocation of biological activity, roots, cracks and recent organic inputs in a sugar beet field. **Geoderma**, Amsterdam v. 56 p. 265-276, 1993.
- VANNUCCI, M. **Os manguezais e nós: uma síntese de percepções**. São Paulo: EDUSP, 1999. 233p.
- WOODHOUSE, W.W.;SENECA, E.D.; BROOME, S.W. **Propagation of *Spartina Alterniflora* for substrate stabilization and salt-marsh development**. Fort Belvoir: U.S. Army Coastal Engineering Research Center. 1974. 155p. (Technical Memo, 46).

3 DIVERSIDADE DE *BACTERIA* EM SOLOS DE MANGUE E MARISMA

Resumo

Diversidade de *Bacteria* em solos de mangue e marisma

Estudos sobre a diversidade de *Bacteria* em solos de mangue (Brasil) e marisma (Espanha) são escassos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de *Bacteria* em solos superficiais (0-10 cm) de mangue sem vegetação (sedimento), com *Spartina alterniflora*, *Rhizophora mangle* e *Avicennia schaueriana* e de marisma com *Spartina maritima* e *Zostera noltii* através de sequenciamento parcial do rDNA 16S. A afiliação filogenética das seqüências de rDNA 16S de *Bacteria* mostram que: aproximadamente 21% das seqüências não puderam ser classificados em filós conhecidos; aproximadamente 90% das seqüências são de gêneros ainda não descritos; *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* estão presentes em todos os solos estudados; a comunidade de *Bacteria* destes ambientes é dominada por *Proteobacteria*; vários dos táxons detectados estão relacionados com ciclos biogeoquímicos importantes para os ambientes estudados. As estimativas não-paramétricas de riqueza de espécies (ACE e Chao1) mostram que solos de mangue e marisma podem conter 200 a 6000 espécies de bactérias e que a riqueza de espécies é maior em mangue com *A. schaueriana* do que em solo de mangue com *S. alterniflora*. A comparação das comunidades bacterianas utilizando o S-LIBSHUFF indicam que o solo de mangue com *A. schaueriana* apresenta diferenças mais significativas em relação aos outros solos de mangue. Os dados mostram também que as comunidades de *Bacteria* dos solos de mangue e marisma são significativamente diferentes. Já os solos de marisma não apresentaram diferença significativas entre as comunidades de *Bacteria*. De uma maneira geral, pode-se concluir que a diversidade e estrutura das comunidades de *Bacteria* de ambientes estuarinos pode variar em função da vegetação estabelecida e do tipo de ambiente. Adicionalmente, solos de mangue e marisma possuem grande diversidade de bactérias, grande parte da qual é desconhecida, podendo representar elevado potencial genético para utilização biotecnológica.

Palavras-chave: mangue; marisma; solo; diversidade microbiana; microrganismos; *Bacteria*; rDNA 16S

Abstract

Bacterial diversity in mangrove and marisma soils

The bacterial diversity in mangrove (Brazil) and marisma (Espanha) soils are largely unknown. Aiming to valuate the bacterial diversity and their variations in mangrove soils without vegetation (sediment) and under *Spartina alterniflora*, *Rhizophora mangle* and *Avicennia schaueriana* and marisma soils under *Spartina maritima* and *Zostera noltii*, partial sequencing of the 16S rDNA from metagenomic DNA . Phylogenetic affiliation shows that about 21% of sequences were not clamped into known phyla. About 90% of sequences belong to unknown genera. *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* were detected in all soils. *Proteobacteria* prevails in bacterial communities of mangue and marisma soils. Several taxa detected are associated to important biogeochemical cycles that occur in estuarine ecosystems. Analysis of species richness showed that mangrove and marisma soils can contain 200 to 6000 species of bacteria. Mangrove soil under *A. schaueriana* have more bacterial species than mangrove soil under *S. alterniflora*. S-LIBSHUFF analysis showed that the mangrove soil under *A. schaueriana* have more genetical differences relation to the other mangrove soils, that marisma soils are not statistically different and that bacterial communities of mangrove and marisma soils are statistically different. We conclude that the bacterial diversity can vary with the studied estuarine ecosystem and vegetation. Studies are necessary concerning to diversity of *Bacteria*, it variation and correlation with biogeochemical process in the mangrove and marisma soils. These soils show a great diversity of bacteria, much of than unknown, which represent a great genetic potential to the biotechnology.

Keywords: mangrove; marisma; soil; microbial diversity; microorganisms; *Bacteria*; 16S rDNA

3.1 Introdução

Apesar dos microrganismos representarem as formas de vida mais abundantes e diversificadas do planeta, detendo a maior proporção da diversidade genética existente, a maior parte das espécies permanece desconhecida (COLEMAN; WIEBE, 1998; ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001; WHITMAN).

Segundo estimativas de Whitman; Coleman e Wiebe (1998), aproximadamente 2 a 3% dos procariotos ocorrem nas águas dos oceanos, 4,5 a 6,5% no solo e a vasta maioria em sub-superfície (abaixo de 8m em ambientes terrestres e 10 cm em sedimentos marinhos). Estudos têm mostrado que os solos possuem uma imensa diversidade de procariotos, podendo conter dezenas de milhares de espécies em apenas um grama (TORSVIK, 1998; CURTIS; SLOAN; SCANNELL, 2002; ØVREÅS; TORSVIK; ØVREÅS, 2002).

Durante muito tempo grande parte da diversidade de procariotos dos solos permaneceu inacessível, já que uma pequena porcentagem (0,1% a 0,5%) pode ser estudada pelos métodos convencionais de cultivo (TORSVIK; GOKSOYR; DAAE, 1990). Técnicas alternativas têm possibilitado o estudo dos microrganismos baseando-se no DNA extraído diretamente dos ambientes. Dentre tais técnicas está o sequenciamento do rDNA 16S que, aliado aos recursos de bioinformática e estatística, nos permite obter informações quantitativas e qualitativas da diversidade de bactérias nos ambientes.

Alguns trabalhos têm revelado que os solos e sedimentos de ecossistemas estuarinos representam grandes bancos genéticos, contendo grande diversidade de microrganismos ainda não estudados (POLYMENAKOU et al., 2005; MARTINY et al., 2006), cuja caracterização genética e funcional será fundamental para o melhor entendimento dos importantes processos biogeoquímicos destes ambientes, assim como para a descoberta de novos genes e processos metabólicos com potencial biotecnológico.

Os papéis da diversidade microbiana em ecossistemas estuarinos são pouco conhecidos. No entanto, os microrganismos desses ambientes devem ser essenciais para a definição dos processos geoquímicos predominantes e para a própria manutenção da estabilidade do ecossistema. O objetivo deste trabalho é avaliar a diversidade de *Bacteria* em sedimento e solos sob diferentes condições edáficas e de vegetação em mangue do Brasil e Marisma da Espanha.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e métodos

3.2.1.1 Área de estudo e amostragem

A área estudada está localizada na Ilha de Pai Matos (24°59'48''S e 47°54'19''W), no complexo estuarino de Iguape e Cananéia, litoral Sul do Estado de São Paulo (ilustrações no Anexo). Nesta região os valores de temperatura e precipitação média anual são de 21°C e 2.200 mm, respectivamente (SCHAEFFER-NOVELLI, 1982; SCHAEFFER-NOVELLI et al., 1990), com amplitude média de maré de 0,82 m (FERREIRA, 2006). Em Março de 2004 foram coletadas amostras da camada superficial do solo (0-10 cm) em área sem vegetação (sedimento – MGSD) ou sob *Spartina alterniflora* (MGSP), *Rizophora mangle* (MGRZ) e *Avicennia schaueriana* (MGAV), ao longo de uma transeção de 180 m (ilustrações no Anexo). Utilizou-se tubos de PVC de 5 cm de diâmetro e 50 cm de comprimento, os quais foram hermeticamente fechados e mantidos em posição vertical sob refrigeração (4°C). Em trabalho complementar, foram realizadas determinações de potencial de oxi-redução (Eh) e pH (FERREIRA, 2006). As amostras de solo de marisma foram coletadas no litoral Noroeste da Espanha, em Julho de 2004, na camada superficial (0-10 cm) do solo sob vegetação de *Spartina maritima* (MRSP) ou *Zostera noltii* (MRZT), distando cerca de 5 m.

As amostras foram transferidas até o laboratório a 4 °C e mantidas a -80 °C em tubos de polietileno de 15mL até o processamento para a extração do DNA.

3.2.1.2 Extração do DNA

Para a extração do DNA do solo, utilizou-se o kit FastDNA Spin for Soil (MP Biomedicals) como descrito no item 2.2.1.2.

3.2.1.3 Bibliotecas de rDNA 16S

Para a construção de bibliotecas de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria* foram utilizados na PCR os iniciadores PRBA63f (5' GGA TCC CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') (MARCHESI et al., 1998) e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREÅS et al., 1997). Os amplicons obtidos foram clonados no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega), segundo as instruções do fabricante. A reação de ligação dos produtos de PCR ao plasmídeo pGEM-T-Easy foi feita utilizando-se tampão de ligação rápida 1X (30 mM de Tris-HCl pH 7.8, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 1 mM de ATP e 5% de polietileno glicol - PEG) e 3 U de T4 DNA ligase. Esse material foi incubado a 4°C durante toda a noite. No dia seguinte células competentes de *E. coli* DH5α foram transformadas por choque térmico utilizando-se a reação de ligação obtida. Após o plaqueamento das células transformadas em meio LB-ágar contendo ampicilina (50 µg mL⁻¹) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactoside), foram selecionadas colônias contendo o plasmídeo recombinante. Estas foram cultivadas em 1 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (50 µg mL⁻¹) a 38°C, sob agitação, durante 22 horas. O meio foi centrifugado a 4000 g por 5 minutos a 4°C. O pélete foi lavado com solução contendo 25 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de EDTA pH 8,0 e 50 mM de glicose. Em seguida, foi adicionada solução contendo 1% de SDS, 0,2 N de NaOH e incubada no gelo por 10 minutos. Foi adicionada solução contendo 3 M de acetato de potássio, 10% de ácido acético glacial, misturou-se por inversão, incubou-se em gelo por 10 minutos e centrifugou-se a 4000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para nova placa, adicionando-se 15 µg de RNase A, e incubou-se a 37°C por 20 minutos. O DNA foi precipitado com isopropanol gelado e incubado em gelo por 5 minutos. Centrifugou-se a 4000 g por 40 minutos a 4°C e lavou-se o pélete em etanol 70% gelado. O pélete foi então seco e ressuspenso em água ultrapura esterilizada. A concentração de DNA foi determinada através de espectrofotometria a 260 nm e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,2% -TBE 0,5X. O DNA foi visualizado por coloração com SYBR-Green I (Molecular Probes) após varredura em densitômetro a laser "FluorImager SI" (Amersham Bioscience). Para o sequenciamento utilizou-se uma alíquota de 200-500 ng de DNA plasmidial. Ao DNA plasmidial foi adicionado 10 pmol do iniciador M13f, 2 µl de "DYEmanic ET Terminator" (Amersham Biosciences), 2 µl de Save Money (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM MgCl₂.6H₂O) e água ultrapura para um volume final de 10 µl. A amplificação foi realizada

nas seguintes condições: 25 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 minuto a 60°C. Os produtos de PCR foram precipitados com 1/10 de volume de uma solução de acetato de sódio 1,5 M e EDTA 250 mM e 6 volumes de etanol 95%. Centrifugou-se a 4000 g por 45 minutos e lavou-se o pélete com etanol 70% à temperatura ambiente. O pélete foi seco no escuro por no mínimo 2 horas e ressuspendido em formamida. O seqüenciador utilizado foi o ABI 3100 (Applied Biosystems).

3.2.1.4 Análises das seqüências de rDNA 16S

As seqüências foram processadas com o programa PHRED (EWING; GREEN, 1998) para a remoção de bases com baixa qualidade (parâmetro de qualidade > 20, menos de um erro em 100 nucleotídeos) e seqüências do vetor.

Para a classificação taxonômica das seqüências utilizou-se o programa RDPquery (http://simo.marisci.uga.edu/public_db/rdp_query.htm) que compara cada seqüência de rDNA 16S com as seqüências depositadas no Ribosomal Database Project (RDP – <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>), e, baseado na distância evolutiva calculada entre as seqüências que serão classificadas e aquelas de maior similaridade no banco de dados, define a possível classificação em diferentes níveis taxonômicos. As seqüências que não chegaram a ser classificadas ao nível de filo por este método foram analisadas no RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) utilizando-se o nível máximo de restrição (Confidence threshold de 95%), além de serem comparadas com seqüências depositadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando-se o MEGABLAST.

Para o agrupamento em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi utilizado o programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Para tanto, utilizou-se uma matriz de distância evolutiva calculada com o DNADIST (algoritmo de Jukes-Cantor) do PHYLIP 3.63 (FELSENSTEIN - <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>), a partir do alinhamento feito no ClustalX 1.83 (THOMPSON et al., 1997), com definições de parâmetros padrão, exceto “gap-opening penalty” (10.0) e “gap-extension penalty” (0.1).

Os números de UTOs e de seqüências de cada UTO foram computados e utilizados com o programa SPADE para o cálculo dos índices de diversidade de Shannon e recíproco de Simpson, e para a estimativa de riqueza de espécies pelos métodos não paramétricos ACE e Chao1 (CHAO e CHEN, <http://chao.stat.nthu.edu.tw>), além da estimativa da cobertura de amostragem.

A comparação entre as bibliotecas de seqüências de rDNA 16S foi feita utilizando-se o programa SLIBSHUFF (SINGLETON et al., 2001 - <http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/S-libshuff.html>) após o alinhamento das seqüências e cálculo das matrizes de distâncias evolutivas conforme descrito acima.

3.2.2 Resultados

A tabela 3.1 mostra a distribuição da freqüência dos táxons de *Bacteria* presentes nos seis solos estudados. Entre 18,8% e 26,6% das seqüências dos solos de mangue não puderam ser classificadas ao nível de filo com o RDPquery, enquanto que para os solos de marisma esta porcentagem ficou entre 21,3% e 22,5% (Tabela 3.1). A Tabela 3.2 mostra a possível afiliação filogenética dessas seqüências e as respectivas seqüências mais similares encontradas no NCBI. Aproximadamente 96% estão relacionadas com seqüências geradas a partir de estudos de ambientes marinhos, estuarinos e sedimentares, com base na similaridade entre elas (Tabela 3.2). Aproximadamente 80% das seqüências foram classificadas como pertencentes ao domínio *Bacteria*. Destas, 17% foram classificadas no filo *Bacteroidetes*, das quais, 40% na ordem *Sphingobacteriales* (Tabela 3.2). Aproximadamente 17% das seqüências que foram classificadas como pertencentes ao domínio *Bacteria* com o RDPquery não tiveram sua classificação confirmada com o RDP Classifier (Tabela 3.2) apesar de, como citado, mostrarem relação com seqüências encontradas em ambientes correlatos. Destas, 32% não apresentaram similaridade com seqüências depositadas em bancos de dados públicos (Tabela 3.2).

Duas seqüências, pertencentes ao solo de marisma com *Zostera noltii* (MRZT043 e MRZT055 – Tabela 3.2), não foram classificadas em domínio com o RDPquery ou RDP Classifier. Após análise utilizando o Chimera Check, foi descartada a possibilidade dessas seqüências representarem quimeras.

Os resultados da afiliação filogenética feita com o RDPquery indicam bactérias de onze filós, sendo que a ocorrência destes variou em função do sedimento e solos estudados (Figura 3.1). Dentre os solos de mangue, MGAV e MGRZ foram os que apresentaram maior e menor número de filós, nove e quatro, respectivamente (Figura 3.1). Para MGSD e MGSP estes números foram de seis e cinco, respectivamente. Já nos solos de marisma foram encontrados oito e sete filós em MRSP e MRZT, respectivamente (Figura 3.1).

Tabela 3.1 – Frequências (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados em sedimento de mangue e solos de mangue e marisma

(continua)

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	MGSD	MGSP	MGRZ	MGAV	MRSP	MRZT
ND	ND	ND	ND	ND	18,8	24,0	24,7	26,6	22,5	21,3
Acidobacteria	Acidobacteria	ND	ND	ND	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	ND	ND	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	ND	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0
Actinobacteria	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
Actinobacteria	Actinobacteria	ND	ND	ND	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,6
Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae	ND	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
				Acidimicrobium	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0,0	0,0	1,3	0,7	0,0	0,6
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	Propionibacterium	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Sporichthyaceae	Sporichthya	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
Bacteroidetes	ND	ND	ND	ND	1,8	1,7	1,3	0,0	3,1	5,6
Bacteroidetes	Bacteroidetes	ND	ND	ND	0,0	0,0	2,6	0,0	0,8	0,0
Bacteroidetes	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Anaerophaga	0,0	0,0	0,0	0,0	3,1	2,5
Bacteroidetes	Flavobacteria	ND	ND	ND	0,0	0,0	2,6	3,60	0,0	2,5
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	ND	ND	1,2	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	ND	1,8	5,8	1,3	0,0	8,5	7,5
				Chryseobacterium	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
				Flavobacterium	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,6
				Robiginitalea	2,4	0,8	0,0	0,0	0,0	2,5
Bacteroidetes	Sphingobacteria	ND	ND	ND	0,6	0,0	0,0	0,7	0,0	0,6
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	ND	ND	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Flexibacteraceae	Roseivirga	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Chloroflexi	ND	ND	ND	ND	0,6	0,0	0,0	2,2	0,0	0,6
Chloroflexi	Anaerolineae	ND	ND	ND	0,0	0,0	3,9	0,7	0,0	0,0

Tabela 3.1 – Frequências (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados em sedimento de mangue e solos de mangue e marisma

(continuação)

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	MGSD	MGSP	MGRZ	MGAV	MRSP	MRZT
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolinaeles	ND	ND	0,0	0,0	2,6	0,7	0,0	0,0
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolinaeles	Anaerolineaceae	ND	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
				Anaerolinea	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3
Cyanobacteria	Cyanobacteria	ND	ND	ND	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	1,3
Cyanobacteria	Cyanobacteria	Prochlorales	ND	ND	0,6	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
Cyanobacteria	Cyanobacteria	Prochlorales	Prochlorococcaceae	Prochlorococcus	1,8	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0
Deferribacteres	Deferribacteres	ND	ND	ND	1,2	0,0	0,0	0,0	3,1	0,6
Deferribacteres	Deferribacteres	Deferribacterales	incerto	ND	0,0	1,7	0,0	0,0	0,8	0,0
				Caldithrix	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
Firmicutes	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0
Firmicutes	Clostridia	ND	ND	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	0,0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	ND	ND	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	ND	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	ND	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0
Nitrospirae	Nitrospira	ND	ND	ND	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	ND	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Nitrospira	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0
Planctomycetes	Planctomycetacia	ND	ND	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	ND	0,0	0,8	0,0	0,0	0,8	0,0
Proteobacteria	ND	ND	ND	ND	2,4	0,8	2,6	2,9	1,6	1,9
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND	ND	ND	2,4	3,3	2,6	5,8	0,8	1,3
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	2,4	0,0	2,6	5,8	1,6	1,9

Tabela 3.1 – Freqüências (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados em sedimento de mangue e solos de mangue e marisma

(continuação)										
Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	MGSD	MGSP	MGRZ	MGAV	MRSP	MRZT
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	ND	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
				Filomicrobium	0,0	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	ND	2,4	1,7	0,0	0,7	0,0	1,3
				Amaricoccus	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
				Hyphomonas	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
				Roseobacter	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
				Sulfitobacter	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ND	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	ND	ND	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	ND	ND	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	ND	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0
				Novosphingobium	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	ND	ND	ND	0,6	0,0	1,3	0,0	0,0	0,6
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	ND	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	ND	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	ND	ND	ND	5,5	2,5	7,8	4,3	2,3	6,9
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	Bacteriovoraceae	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	ND	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	Desulfobacteraceae	ND	1,2	1,7	0,0	2,2	7,0	2,5
				Desulfosarcina	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	Desulfobulbaceae	ND	2,4	1,7	3,9	0,0	4,7	2,5
				Desulfobulbus	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
				Desulforhopalus	0,6	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonales	Desulfuromonaceae	ND	0,6	0,8	0,0	1,4	0,8	0,0
				Pelobacter	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0

Tabela 3.1 – Frequências (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados em sedimento de mangue e solos de mangue e marisma

(conclusão)

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	MGSD	MGSP	MGRZ	MGAV	MRSP	MRZT
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	ND	ND	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Polyangiaceae	ND	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3
				Chondromyces	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	ND	ND	0,6	0,8	0,0	1,4	0,8	0,6
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae	ND	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Helicobacteraceae	Sulfurimonas	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,6
				Sulfurovum	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND	ND	ND	17,6	33,1	19,5	23,7	13,2	17,5
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	ND	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Colwelliaceae	Thalassomonas	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Incertae sedis 7	Marinobacter	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	ND	ND	1,8	5,0	1,3	0,0	0,0	1,9
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	1,3
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae	ND	4,2	3,3	2,6	0,7	6,2	1,3
				Thioalkalispira	0,6	0,0	6,5	0,0	0,8	0,0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	ND	1,2	0,0	1,3	0,0	0,0	0,6
				Methylobacter	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	ND	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
				Oceanospirillum	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	ND	ND	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	ND	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
				Pseudomonas	6,7	1,7	0,0	0,0	0,8	0,0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	ND	ND	0,0	0,0	1,3	0,7	0,0	0,0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio	0,6	0,8	1,3	2,9	0,0	0,0

MGSD – sedimento de mangue sem vegetação; MGSP – solo de mangue com *Spartina alterniflora*; MGRZ – solo de mangue com *Rhizophora mangle*; MGAV – solo de mangue com *Avicennia schaueriana*; MRSP – solo de marisma com *Spartina maritima* (MRSP); MRZT – solo de marisma com *Zostera noltii*

Tabela 3.2 – Afiliação filogenética de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria* encontradas em sedimento de mangue e solos de mangue e marisma

(continua)

Seqüência	Classificação* ¹	ID (%)* ²	e-value* ³	Acesso* ⁴	Autor* ⁵	Organismo / Ambiente
MGSP081	<i>Flexibacteraceae</i>	94,9	0	AB013834.1	YANAGIBAYASHI et al., 1999	procariotos – sedimento oceânico
MGAV028	ND* ⁶	73,9	8,00E-24	AB015547.1	LI; KATO; HORIKOSHI, 1999	<i>Bacteria</i> – sedimento oceânico
MGRZ068	ND	87,0	1,00E-141	AB175560.1	NAKAGAWA et al., 2005	procariotos – sedimento hidrotermal
MRSP066	ND	77,7	2,00E-50	AB177153.1	INAGAKI et al., 2006	procariotos – sedimento oceânico
MRSP085	Filo <i>Bacteroidetes</i>	90,3	2,00E-174	AB177293.1	* ⁷	
MRZT011	Filo <i>Bacteroidetes</i>	87,4	2,00E-153	AB239051.1	ARAKAWA et al., 2005 (np)* ⁸	<i>Bacteria</i> – sedimento oceânico
MGRZ008	<i>Bacteria</i>	83,4	9,00E-103	AF027060.1	HUGENHOLTZ et al., 1998	<i>Bacteria</i> – hidrotermal
MRZT012	<i>Sphingobacteriales</i>	96,1	0	AF365502.1	ROHWER, 2001 (np)	procariotos – corais
MRZT142	<i>Bacteria</i>	87,1	9,00E-118	AF365516.1		
MGSD113	<i>Bacteria</i>	92,5	0	AF365666.1		
MGSP077	<i>Bacteria</i>	89,2	4,00E-136			
MGSP088	<i>Bacteria</i>	89,2	4,00E-136	AF365757.1		
MGSP091	<i>Bacteria</i>	88,9	2,00E-134			
MGRZ018	<i>Bacteria</i>	96,9	0	AF365758.1		
MRZT012	<i>Sphingobacteriales</i>	93,3	0	AF365760.1		
MRSP043	<i>Bacteria</i>	94,2	0	AF419664.1	TESKE et al., 2002	procariotos – sedimento hidrotemal
MRZT086	<i>Bacteria</i>	83,8	3,00E-72	AF441963.1	FRIAS-LOPEZ et al., 2002	<i>Bacteria</i> – coral
MGSP009	<i>Bacteria</i>	94,6	0	AJ428452.1	ALEXANDER; IMHOFF, 2002 (np)	sulfato redutores – sedimento
MRSP100	<i>Bacteria</i>	90,6	4,00E-131	AJ518229.1	WOBUS et al., 2003	procariotos – sedimento
MGSD052	<i>Bacteria</i>	85,0	9,00E-73	AJ535229.1	KNITTEL et al., 2003	sulfato redutores – sedimento
MGSD151	ND	88,3	1,00E-110	AJ567570.1	XU et al., 2003 (np)	procariotos – sedimento oceânico
MGSD079	ND	80,5	1,00E-47	AJ810688.1	YAKIMOV et al., 2005	procariotos – sedimento
MRZT160	<i>Bacteria</i>	93,7	1,00E-170	AJ853561.1	HUANG et al., 2005	<i>Bacteria</i> – sedimento
MGSP121	ND	92,9	4,00E-12	AJ966233.1	DORIGO et al., 2005 (np)	<i>Bacteria</i> – sedimento
MGSP105	<i>Bacteria</i>	94,6	0			
MGSP118	ND	80,4	5,00E-80	AJ966601.1	XU, 2005 (np)	procariotos – sedimento oceânico
MGSP120	<i>Bacteria</i>	94,3	0			
MGAV020	<i>Bacteria</i>	80,8	3,00E-67	AJ969442.1		
MRZT145	<i>Bacteria</i>	90,7	1,00E-151	AM040134.1		procariotos – sedimento
MGAV015	<i>Bacteria</i>	79,6	1,00E-06	AY046066.1		procariotos – esponja marinha
MGAV060	<i>Bacteria</i>	77,7	8,00E-39	AY214674.1		procariotos – solo

Tabela 3.2 – Afiliação filogenética de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria* encontradas em sedimento de mangue e solos de mangue e marisma

(continuação)

Clone	Classificação	ID (%)	e-value	Acesso	Autor	Organismo / Ambiente
MGSP027	<i>Bacteria</i>	93,0	4,00E-166	AY225641.1	LOPEZ-GARCIA et al., 2003	<i>Bacteria</i> – sedimento hidrotermal
MGAV016	<i>Bacteria</i>	98,6	0	AY242806.1	GREMION; CHATZINOTAS; HARMS, 2003	<i>Bacteria</i> – solo
MRZT088	ND	97,3	4,00E-07	AY251224.1	VANBROEKHOVEN et al., 2003 (np)	procariotos – biorreator
MGSP040	Filo <i>Bacteroidetes</i>	96,9	0	AY254973.1	KIM et al., 2004	<i>Bacteria (Chloroflexaceae)</i> – sedimento
MRSP088	Filo <i>Bacteroidetes</i>	91,1	0			
MGSD134	<i>Bacteria</i>	94,0	1,00E-176	AY254982.1		
MGRZ064	<i>Bacteria</i>	95,7	0	AY254988.1		
MGSD023	<i>Bacteria</i>	89,6	1,00E-140			
MGSD139	<i>Bacteria</i>	95,9	0	AY304371.1		
MGSD149	<i>Bacteria</i>	95,9	0			
MGSD138	<i>Bacteria</i>	96,1	0	AY304372.1		
MRSP078	<i>Bacteria</i>	94,1	2,00E-158			
MRZT139	<i>Bacteria</i>	94,5	0	AY304373.1		
MGSD161	<i>Bacteria</i>	95,0	0	AY304374.1		
MGSD078	<i>Bacteria</i>	100	5,00E-06	AY351641.1	WONG et al., 2004	<i>Bacteria (Alphaproteobacteria)</i> – lodo ativado
MRSP026	<i>Bacteria</i>	94,2	0	AY354188.1	NERCESSIAN et al., 2005	procariotos – sedimento
MRSP033	<i>Bacteria</i>	94,0	0			
MRSP116	Filo <i>Bacteroidetes</i>	92,6	1,00E-165	AY381283.1	TIAN et al., 2003 (np)	procariotos – sedimento
MGAV024	<i>Bacteria</i>	86,1	2,00E-98			
MGAV026	<i>Bacteria</i>	88,0	4,00E-146			
MGAV047	<i>Bacteria</i>	88,4	1,00E-151	AY435187.1	BURNS et al., 2004	procariotos – sedimento
MGAV063	<i>Bacteria</i>	87,6	9,00E-108			
MGAV094	<i>Bacteria</i>	87,0	2,00E-104			
MRSP103	<i>Bacteria</i>	99,0	0	AY456984.1		<i>Bacteria</i> – sedimento oceânico
MGAV072	ND	100	2,00E-04	AY512254.1		<i>Bacteria</i> – matéria orgânica
MGSP023	<i>Bacteria</i>	92,5	0			
MGSP028	<i>Bacteria</i>	92,5	0	AY533894.1		<i>Bacteria</i> – sedimento
MGSP057	<i>Bacteria</i>	91,1	0			
MRSP087	<i>Bacteria</i>	91,5	0			
MGSD037	<i>Bacteria</i>	91,4	5,00E-155			
MGSP045	<i>Bacteria</i>	93,1	0	AY533905.1		
MGSP064	<i>Bacteria</i>	93,1	0			

Tabela 3.2 – Afiliação filogenética de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria* encontradas em sedimento de mangue e solos de mangue e marisma

(continuação)

Clone	Classificação	ID (%)	e-value	Acesso	Autor	Organismo / Ambiente
MGSP038	<i>Bacteria</i>	89,0	2,00E-124	AY534056.1		
MGSP042	<i>Bacteria</i>	89,0	2,00E-124			
MGSP050	<i>Bacteria</i>	89,0	2,00E-124			
MGAV053	<i>Bacteria</i>	93,1	0			
MGAV070	<i>Bacteria</i>	93,0	0	AY534062.1		
MGSD053	<i>Bacteria</i>	94,9	6,00E-169			
MGAV041	<i>Bacteria</i>	96,0	0	AY568762.1	CHO; HYUN; LEE, 2004 (np)	<i>Bacteria</i> – sedimento
MGSP001	<i>Bacteria</i>	98,3	0			
MRSP092	<i>Bacteria</i>	94,0	0	AY568849.1		
MRZT107	<i>Bacteria</i>	96,6	0			
MGRZ067	<i>Bacteria</i>	96,2	0	AY568890.1		
MGSD156	<i>Bacteria</i>	90,9	6,00E-154	AY568933.1		
MGRZ076	<i>Bacteria</i>	91,7	1,00E-175	AY592152.1	HEIJS; Van der WIELEN; FORNEY, 2004 (np)	procariotos – sedimento vulcânico
MRSP110	<i>Bacteria</i>	92,4	5,00E-180			
MRZT091	<i>Bacteria</i>	92,4	0	AY592326.1		
MGSP002	ND	86,7	1,00E-101	AY592650.1		
MGSD013	<i>Bacteria</i>	90,0	2,00E-138	AY651285.1	DABERT; DELGENES; GODON, 2005	<i>Bacteria</i> – lodo ativado
MRZT064	Filo <i>Bacteroidetes</i>	91,6	6,00E-149	AY701461.1	GREEN; BOLCH, 2004 (np)	<i>Bacteria</i> – oceano
MGAV008	<i>Bacteria</i>	96,0	5,00E-180	AY710434.1	MORAN; WHITMAN; YE., 2004 (np)	procariotos – salt marsh
MRZT100	<i>Bacteria</i>	95,9	0	AY710443.1		
MRSP047	<i>Bacteria</i>	95,2	0	AY710451.1		
MGSP067	<i>Bacteria</i>	89,6	1,00E-145	AY710477.1		
MRSP016	ND	81,7	6,00E-50	AY710503.1		
MGRZ058	<i>Bacteria</i>	89,7	1,00E-160	AY710524.1		
MRZT047	Sphingobacterales	96,7	0	AY710526.1		
MRZT075	ND	88,9	2,00E-44	AY710527.1		
MRSP062	<i>Bacteria</i>	91,0	6,00E-154	AY710554.1		
MRZT087	<i>Bacteria</i>	86,6	4,00E-106	AY710582.1		
MGRZ028	Filo <i>Bacteroidetes</i>	93,9	1,00E-165	AY710588.1		
MGSD003	Filo <i>Bacteroidetes</i>	99,5	0	AY710615.1		
MGAV124	<i>Bacteria</i>	90,8	5,00E-140			
MGSP065	<i>Bacteria</i>	92,1	6,00E-164			

Tabela 3.2 – Afiliação filogenética de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria* encontradas em sedimento de mangue e solos de mangue e marisma

(continuação)

Clone	Classificação	ID (%)	e-value	Acesso	Autor	Organismo / Ambiente
MRSP018	<i>Bacteria</i>	97,1	0	AY710627.1		
MRSP042	<i>Bacteria</i>	98,5	0			
MRSP101	<i>Bacteria</i>	96,9	0			
MRSP115	<i>Bacteria</i>	94,6	0			
MGAV138	<i>Bacteria</i>	82,9	4,00E-76	AY710634.1		
MGSD049	ND	85,4	2,00E-98			
MRZT012	<i>Sphingobacteriales</i>	92,1	0	AY710651.1		
MGSD065	<i>Bacteria</i>	95,1	4,00E-161	AY710663.1		
MRSP057	<i>Bacteria</i>	98,2	0	AY710792.1		
MGRZ056	<i>Bacteria</i>	96,5	0			
MGSD007	<i>Bacteria</i>	96,3	0			
MGSD085	<i>Bacteria</i>	96,1	0	AY710807.1		
MGSP086	<i>Bacteria</i>	95,5	0			
MRZT160	<i>Bacteria</i>	95,0	6,00E-179			
MGAV013	<i>Bacteria</i>	92,8	3,00E-157	AY710808.1		
MGSD048	<i>Filo Bacteroidetes</i>	99,8	0	AY710818.1		
MRSP044	<i>Bacteria</i>	95,3	6,00E-179	AY710838.1		
MGSD140	<i>Bacteria</i>	98,2	0	AY710860.1		
MGSP082	<i>Bacteria</i>	98,8	0			
MGSP100	<i>Bacteria</i>	99,2	0			
MGAV017	<i>Bacteria</i>	88,0	1,00E-115	AY710872.1		
MRZT151	<i>Bacteria</i>	93,4	7,00E-124	AY710942.1		
MGAV111	ND	85,7	1,00E-111	AY710984.1		
MGSD141	<i>Bacteria</i>	96,3	5,00E-160	AY711005.1		
MGSD126	<i>Flexibacteraceae</i>	100	0	AY711020.1		
MRZT012	<i>Sphingobacteriales</i>	98,7	0	AY711066.1		
MRZT138	<i>Bacteria</i>	97,0	0	AY711163.1		
MGAV091	<i>Bacteria</i>	95,1	4,00E-171	AY711233.1		
MRSP045	<i>Filo Bacteroidetes</i>	90,3	2,00E-148	AY711285.1		
MRZT068	<i>Filo Bacteroidetes</i>	91,0	2,00E-148	AY711339.1		
MGSP061	<i>Bacteria</i>	95,7	0	AY711388.1		
MRZT012	<i>Sphingobacteriales</i>	94,7	0	AY711441.1		

Tabela 3.2 – Afiliação filogenética de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria* encontradas em sedimento de mangue e solos de mangue e marisma

(continuação)

Clone	Classificação	ID (%)	e-value	Acesso	Autor	Organismo / Ambiente
MRZT109	Filo <i>Bacteroidetes</i>	97,9	0	AY711593.1		
MRZT143	<i>Bacteria</i>	98,7	0	AY711646.1		
MRZT104	<i>Bacteria</i>	91,8	2,00E-153	AY711698.1		
MGAV109	<i>Bacteria</i>	88,3	1,00E-106	AY711725.1		
MGAV131	<i>Bacteria</i>	89,1	1,00E-135	AY711734.1		
MRSP094	<i>Bacteria</i>	92,3	0			
MRZT130	<i>Bacteria</i>	98,1	0	AY711739.1		
MRZT012	<i>Sphingobacteriales</i>	98,9	0	AY711778.1		
MRZT141	<i>Bacteria</i>	75,9	1,00E-36			
MGRZ069	<i>Bacteria</i>	93,9	0	AY711807.1		
MGAV035	ND	82,0	9,00E-68	AY711875.1		
MRZT012	<i>Sphingobacteriales</i>	91,5	0	AY711922.1		
MGSD020	<i>Bacteria</i>	96,8	0	AY712362.1		
MGSD040	<i>Bacteria</i>	96,8	0	AY712362.1		
MGAV105	<i>Bacteria</i>	82,6	2,00E-79	AY712439.1		
MRZT012	<i>Sphingobacteriales</i>	96,7	0	AY712439.1		
MGSP075	<i>Bacteria</i>	90,9	2,00E-153	AY712452.1		
MRZT135	Filo <i>Bacteroidetes</i>	93,5	2,00E-173	AY768987.1		procariotos – sedimento
MGRZ062	<i>Bacteroidetes</i>	92,6	6,00E-159	AY795722.2		procariotos – sedimento
MRZT076	<i>Bacteria</i>	80,3	3,00E-58	AY940520.1		procariotos – sedimento
MGSD097	<i>Bacteria</i>	86,4	3,00E-87	BX294883.1		<i>Bacteria</i> – lodo
MRZT065	ND	100	8,00E-04	DQ103637.1		<i>Bacteria</i> – hipersalino
MGAV032	ND	98,8	3,00E-33	DQ112471.1		<i>Bacteria</i> – sedimento
MGRZ015	ND	87,9	4,00E-96	DQ138962.1		procariotos – solo
MGAV082	ND	73,3	6,00E-15	DQ145124.1		<i>Proteobacteria</i> – sedimento
MGRZ048	<i>Bacteria</i>	91,1	1,00E-150	DQ154813.1		Procariotos – hipersalino
MGRZ051	<i>Bacteria</i>	89,9	3,00E-142			
MRZT132	<i>Bacteria</i>	92,5	2,00E-169	DQ154824.1		
MGSD051	ND	78,6	2,00E-29	DQ190797.1		<i>Bacteria</i> – solo
MRSP120	ND	76,1	8,00E-29	DQ211460.2		<i>Bacteria</i> – fluvial
MGAV010	<i>Bacteria</i>	80,8	3,00E-78	DQ228757.1		não especificado
MGAV100	<i>Bacteria</i>	89,8	6,00E-164	DQ329894.1		procariotos – hipersalino

Tabela 3.2 – Afiliação filogenética de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria* encontradas em sedimento de mangue e solos de mangue e marisma

(conclusão)

Clone	Classificação	ID (%)	e-value	Acesso	Autor	Organismo / Ambiente
MGSD130	<i>Bacteria</i>	92,6	0	DQ330016.1		
MGRZ004	<i>Bacteria</i>	94,4	4,00E-171	DQ330146.1		
MRZT042	<i>Filo Bacteroidetes</i>	93,3	0	DQ351801.1	GILLAN; PERNET, 2006 (np)	procariotos – sedimento
MGSD159	<i>Bacteria</i>	97,8	0	DQ351811.1		
MGRZ077	<i>Bacteria</i>	96,5	0	DQ394964.1	ZHANG; QIAN, 2006 (np)	procariotos – sedimento
MRZT050	<i>Bacteria</i>	91,3	5,00E-155	DQ394979.1		
MGAV006	<i>Bacteria</i>	84,9	3,00E-107	DQ395374.1	PENN et al., 2006 (np)	não especificado
MGAV075	<i>Bacteria</i>	79,6	1,00E-46			
MRZT012	<i>Bacteria</i>	91,7	0	DQ415767.1	MACALADY et al., 2006 (np)	procariotos – biofilme em caverna
MRSP064	<i>Filo Bacteroidetes</i>	90,1	1,00E-176	DQ415815.1		
MGRZ037	<i>Bacteria</i>	86,2	2,00E-148	DQ444076.1	ZHAO; REN; WANG, 2006 (np)	procariotos – sedimento
MGRZ065	<i>Bacteria</i>	76,7	4,00E-27	DQ450176.1	PICCINI et al., 2006 (np)	<i>Bacteria</i> – água de estuário
MGAV052	ND	não encontrado	-	-	-	-
MGAV056	ND					
MGAV068	ND					
MGAV086	ND					
MGAV087	ND					
MGAV103	ND					
MGSD050	ND					
MGSP084	ND					
MRSP060	ND					
MRZT020	ND					
MRZT031	ND					
MRZT043	ND					
MRZT055	ND					

MGSD – sedimento de mangue sem vegetação; MGSP – solo de mangue com *Spartina alterniflora*; MGRZ – solo de mangue com *Rhizophora mangle*; MGAV – solo de mangue com *Avicennia schaueriana*; MRSP – solo de marisma com *Spartina maritima* (MRSP); MRZT – solo de marisma com *Zostera noltii*. *1 – Menor táxon definido com o RDP Classifier do RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) com nível máximo de restrição (Confidence threshold – 95%); *2 – Valor de identidade entre as seqüências estudada e a de maior similaridade no banco de dados; *3 – e-value entre as seqüências estudada e a de maior similaridade no banco de dados; *4 – Número de acesso da seqüência de maior similaridade no banco de dados; *5 – Autores do trabalho do qual se originou a seqüência de maior similaridade; *6 – Não determinado; *7 – A linha em branco representa a repetição da linha anterior; *8 – Trabalho não publicado.

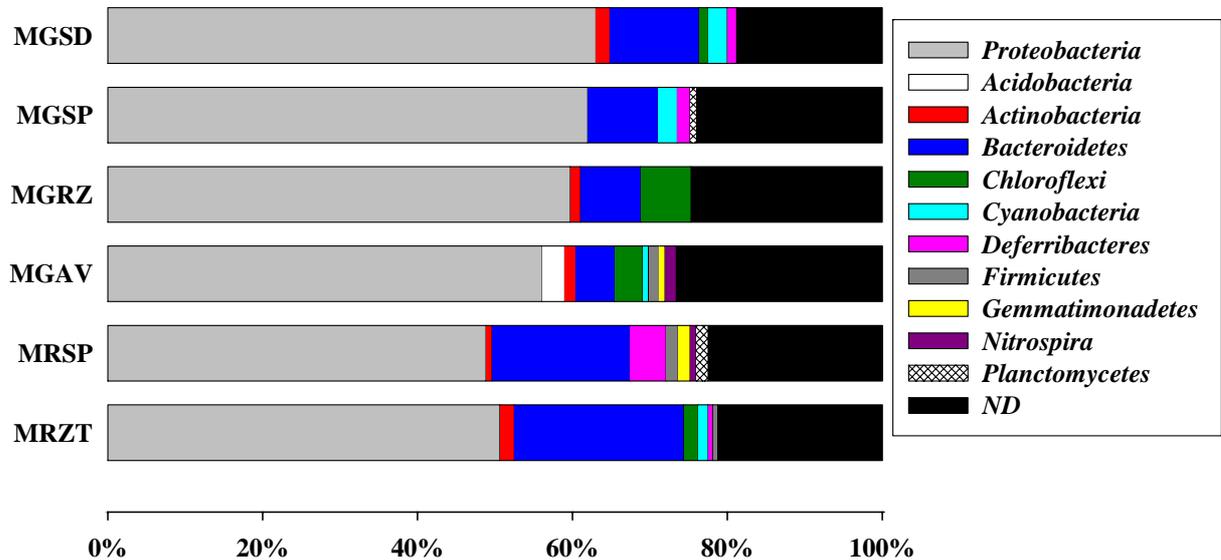


Figura 3.1 – Ocorrência relativa de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria*, classificadas com o RDPquery, dos diferentes filos em sedimento de mangue sem vegetação (MGSD), solo de mangue com *Spartina alterniflora* (MGSP), *Rhizophora mangle* (MGRZ) e *Avicennia schaueriana* (MGAV) e em solo de marisma com *Spartina maritima* (MRSP) e *Zostera noltii* (MRZT)

Bactérias do filo *Proteobacteria* são as mais freqüentes, representando aproximadamente de 50% a 60% do total de seqüências, seguidas por bactérias do filo *Bacteroidetes*, com 5% a 20% do total das seqüências, dependendo do solo (Figura 3.1). Esses filos foram os dois únicos encontrados em todos os solos de mangue e marisma estudados. De uma maneira geral, a proporção de seqüências representando *Proteobacteria* foi menor no solo de marisma do que em mangue, enquanto que a proporção de seqüências representando *Bacteroidetes* foi maior (Figura 3.1).

Considerando *Proteobacteria*, a classe *Gammaproteobacteria* representa aproximadamente 52% a 77% das seqüências encontradas em mangue, dependendo do solo (Figura 3.2a). Para *Deltaproteobacteria* esses valores ficaram entre 18% e 23%. Nos solos de marisma cerca de 48% das seqüências foram classificadas como *Gammaproteobacteria* enquanto que para *Deltaproteobacteria* estes valores foram de aproximadamente 30% e 35% em MRZT e MRSP, respectivamente. *Epsilonproteobacteria* foi encontrada apenas nos solos de marisma (Figura 3.2a).

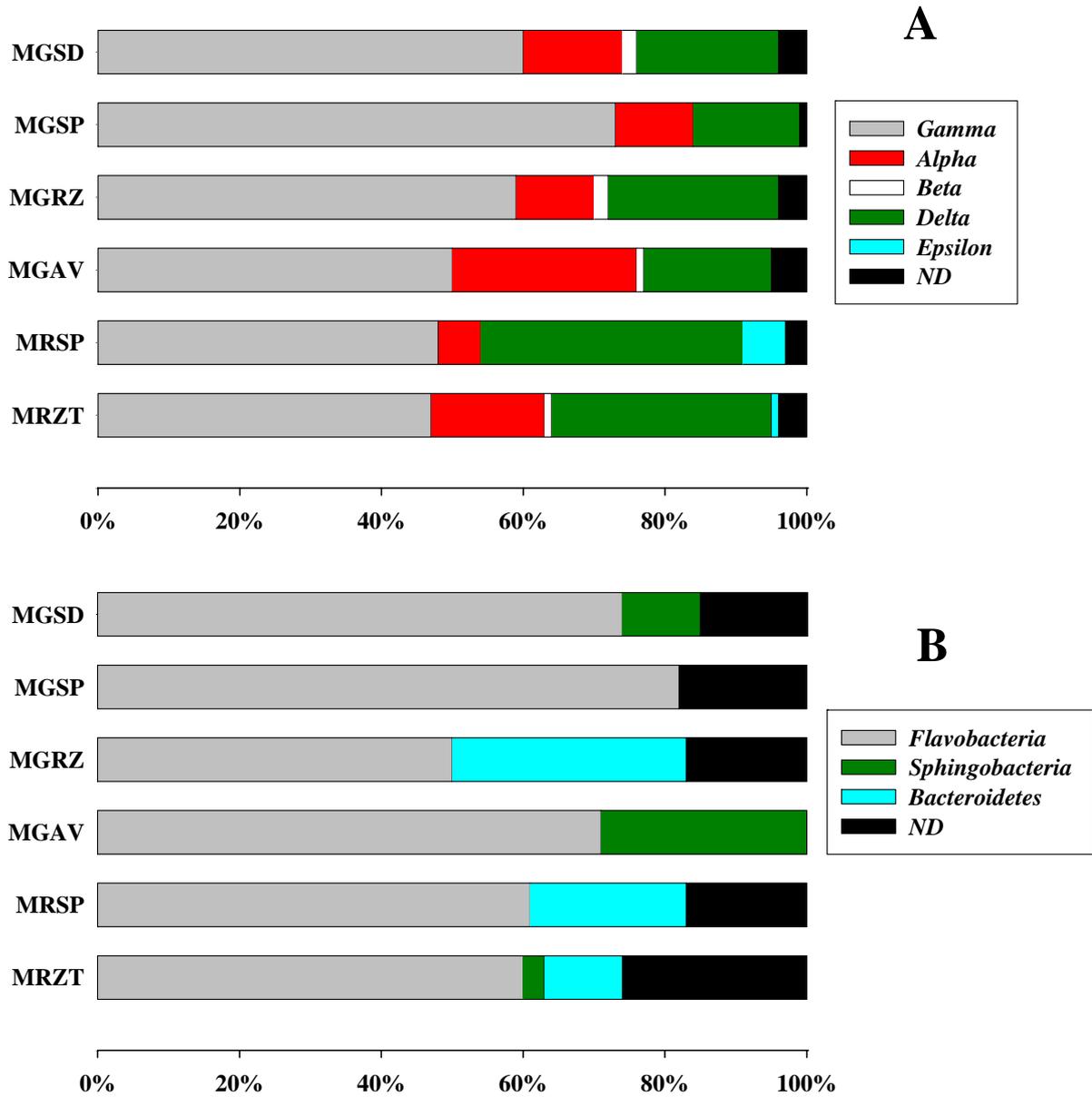


Figura 3.2 – Ocorrência relativa de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria*, classificadas com o RDPquery, das classes de *Proteobacteria* (A) e *Bacteroidetes* (B) em sedimento de mangue sem vegetação (MGSD), solo de mangue com *Spartina alterniflora* (MGSP), *Rhizophora mangle* (MGRZ) e *Avicennia schaueriana* (MGAV) e em solo de marisma com *Spartina maritima* (MRSP) e *Zostera noltii* (MRZT)

Considerando o filo *Bacteroidetes*, a classe *Flavobacteria* representa aproximadamente 50% a 82% das seqüências encontradas em mangue, dependendo do solo (Figura 3.2b). A classe *Bacteroidetes* foi encontrada apenas em MGRZ, com uma freqüência de 32%, enquanto que *Sphingobacteria* foi encontrada em MGSD e MGAV, representando aproximadamente 10% e 30% das seqüências, respectivamente (Figura 3.2b). Seqüências classificadas como *Bacteroidetes* (classe) e *Sphingobacteria* não foram encontradas em MGSP. Nos solos de marisma, *Bacteroidetes* (classe) representou entre 11% e 22% das seqüências de *Bacteroidetes* (filo), sendo que *Sphingobacteria* foi encontrada apenas em MRZT, com uma freqüência de aproximadamente 3% (Figura 3.2b). Apenas em MRZT foram encontradas seqüências classificadas nas três classes de *Bacteroidetes* encontradas (Figura 3.2b).

Na Tabela 3.3 são apresentados os índices de diversidade, estimativa de número de UTOs (espécies) e estimativa de cobertura de amostragem, considerando-se distâncias evolutivas de 0,01 e 0,03 para a definição das UTOs.

A riqueza de UTOs aumenta nos solos de mangue com vegetação mais estruturada, sendo estatisticamente diferente entre MGSP e MGAV, considerando o intervalo com 95% de confiança (Tabela 3.3). Estas diferenças podem ser observadas entre os solos de mangue, para outras distâncias evolutivas, na Figura 3.3a, onde são apresentados os números de filotipos estimados pelo algoritmo Chao1. Os valores dos índices de Shannon e Simpson também indicam maior diversidade em MGAV, sendo estatisticamente diferentes de MGSP, com variação de significância estatística em função do índice e do solo, considerando o intervalo (Tabela 3.3).

Nos solos de marisma não houve diferença significativa de riqueza de UTOs entre MRSP e MRZT (Tabela 3.3 e Figura 3.3b). Os valores de índice de Shannon indicam maior diversidade em MRZT, não havendo diferença significativa entre os valores de índice de Simpson (Tabela 3.3).

Considerando $d = 0,01$, o número de UTOs é maior nos solos de mangue, havendo inversão destes valores a partir de $d = 0,03$, não havendo, porém, diferença significativa se considerarmos os intervalos (Tabela 3.3 e Figura 3.3c).

A Tabela 3.4 mostra as comparações múltiplas entre as bibliotecas usando o S-LIBSHUFF. MGAV foi estatisticamente diferente de MGSP ($P \leq 0,01$) e MGSD ($P \leq 0,05$), não diferindo de MGRZ (Tabela 3.4). MGRZ também não diferiu de MGSD e MGSP (Tabela 3.4). MGSD e MGSP diferiram estatisticamente ($P \leq 0,05$). As comunidades de *Bacteria* dos solos de

Tabela 3.3 – Estimativas de riqueza de UTOs, índices de diversidade e cobertura de amostragem calculados a partir de bibliotecas de rDNA 16S de *Bacteria* de sedimento de mangue e solos de mangue e marisma.

Comunidade	NS ^a	NU ^b	Estimativa de Riqueza de UTOs		Índices de Diversidade		ECA ^e
			ACE	Chao1	Shannon ^c	1/D ^d	
D = 0,01							
MGSD	165	133	566 (383; 884)	511 (339; 829)	4,80 (4,74; 4,87)	108,5 (93,4; 129,4)	0,333
MGSP	121	91	233 (172; 339)	200 (147; 302)	4,43 (4,36; 4,51)	76,6 (66,3; 90,9)	0,455
MGRZ	77	74	2702 (572; 13947)	2666 (565; 13760)	4,28 (4,23; 4,34)	57,5 (56,3; 91,6)	0,065
MGAV	139	130	1254 (659; 2520)	1193 (612; 2473)	4,84 (4,80; 4,88)	121,5 (104,0; 146,2)	0,122
MRSP	129	116	1314 (617; 2983)	1261 (579; 2949)	4,70 (4,64; 4,77)	102,4 (86,2; 125,2)	0,171
MRZT	160	147	2120 (978; 4831)	2051 (928; 4788)	4,95 (4,90; 5,00)	131,9 (113,1; 158,2)	0,137
MG ^f	502	413	2055 (1587; 2711)	1880 (1428; 2532)	5,94 (5,90; 5,98)	335,6 (305,8; 373,1)	0,301
MR ^g	289	260	3309 (1886; 5979)	3188 (1786; 5878)	5,50 (5,46; 5,55)	222,7 (196,1; 257,7)	0,163
D = 0,03							
MGSD	165	124	500 (337; 789)	451 (297; 740)	4,69 (4,60; 4,78)	89,8 (73,2; 116,4)	0,400
MGSP	121	87	221 (162; 317)	190 (139; 293)	4,37 (4,29; 4,45)	71,4 (61,9; 84,5)	0,496
MGRZ	77	71	853 (333; 2400)	819 (313; 2387)	4,22 (4,14; 4,30)	62,4 (49,0; 85,8)	0,130
MGAV	139	126	1325 (662; 2811)	1267 (618; 2769)	4,79 (4,73; 4,85)	110,2 (92,8; 136,4)	0,158
MRSP	129	108	587 (354; 1041)	541 (318; 998)	4,61 (4,53; 4,68)	89,9 (75,9; 110,4)	0,279
MRZT	160	138	969 (571; 1731)	907 (522; 1677)	4,85 (4,77; 4,92)	109,4 (88,4; 143,5)	0,225
MG	502	383	1855 (1417; 2478)	1697 (1275; 2318)	5,81 (5,8; 5,86)	271,0 (236,4; 317,5)	0,371
MR	289	227	1336 (909; 2029)	1238 (826; 1934)	5,31 (5,24; 5,37)	162,1 (130,2; 214,6)	0,302

MGSD – sedimento de mangue sem vegetação; MGSP – solo de mangue com *Spartina alterniflora*; MGRZ – solo de mangue com *Rhizophora mangle*; MGAV – solo de mangue com *Avicennia schaueriana*; MRSP – solo de marisma com *Spartina maritima* (MRSP); MRZT – solo de marisma com *Zostera noltii*. ^aNúmero de seqüências. ^bNúmero de UTOs determinado pelo DOTUR. ^cEstimador de máxima semelhança. ^dRecíproco do índice de Simpson (estimador de máxima semelhança). ^eEstimativa de cobertura de amostragem ^fTodas as seqüências de solo de mangue. ^gTodas as seqüências de solo de marisma. Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança

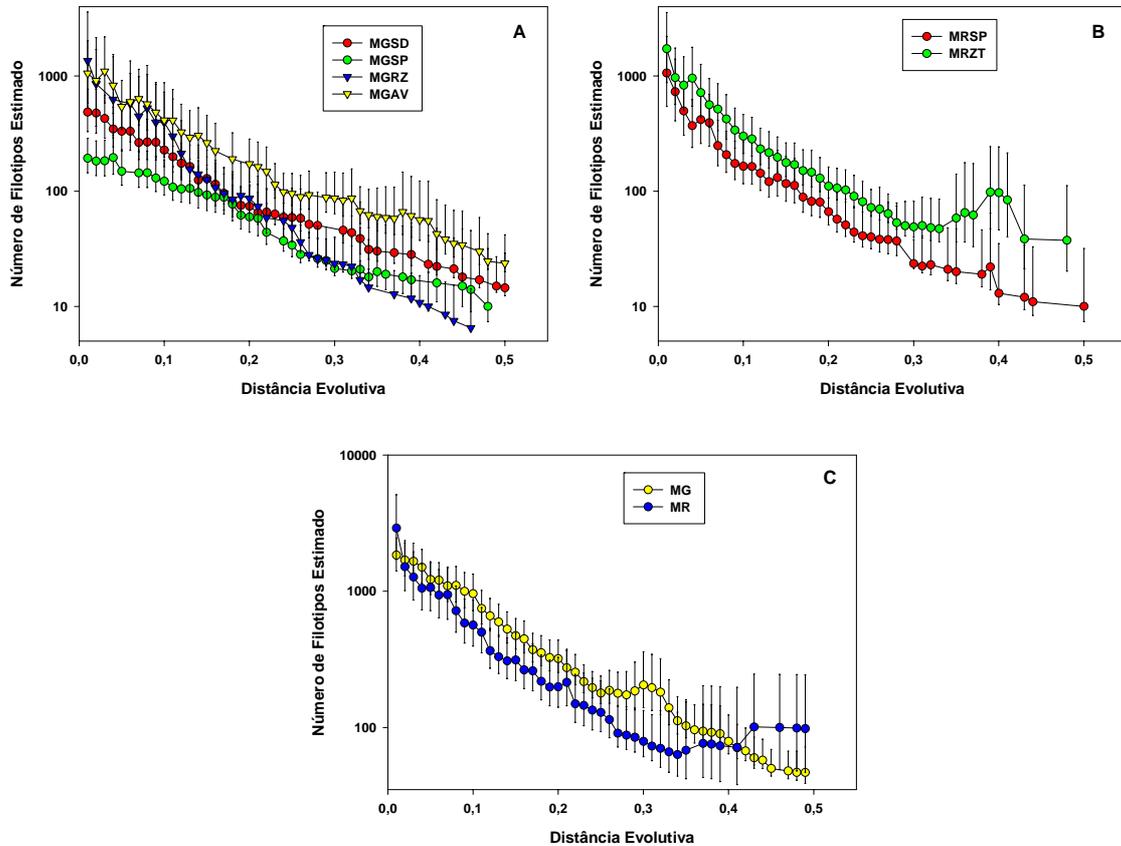


Figura 3.3 – Número de filotipos de *Bacteria* estimado para diferentes distâncias evolutivas em sedimento de mangue (MGSD), solo de mangue com *Spartina alterniflora* (MGSP), *Avicennia schaueriana* (MGAV) e *Rhizophora mangle* (MGRZ) e solo de marisma com *Spartina maritima* (MRSP) e *Zostera noltii* (MRZT) utilizando-se o estimador não-paramétrico Chao1. As barras representam o intervalo com 95% de confiança

Tabela 3.4 – Valores de p calculado nas comparações múltiplas entre as bibliotecas de rDNA 16S das comunidades de *Bacteria* usando o S-LIBSHUFF.

X	Y					
	MGSD	MGSP	MGRZ	MGAV	MRSP	MRZT
MGSD	-	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
MGSP	0,0009	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
MGRZ	0,9535	0,2672	-	0,2974	0,7931	0,9233
MGAV	0,0008	0,0000	0,0007	-	0,0000	0,0000
MRSP	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000	-	0,0248
MRZT	0,0005	0,0004	0,0000	0,0000	0,0319	-

MGSD – sedimento de mangue sem vegetação; MGSP – solo de mangue com *Spartina alterniflora*; MGRZ – solo de mangue com *Rhizophora mangle*; MGAV – solo de mangue com *Avicennia schaueriana*; MRSP – solo de marisma com *Spartina maritima* (MRSP); MRZT – solo de marisma com *Zostera noltii*. X homólogo na coluna e Y homólogo na linha. Valores mínimos para diferença significativa: 0,0003 e 0,0017 para 1% e 5% de probabilidade, respectivamente.

marisma não diferiram estatisticamente (Tabela 3.4).

A comparação simples usando o S-LIBSHUFF mostrou que as comunidades de *Bacteria* de mangue e marisma são estatisticamente diferentes ($P \leq 0,01$), com valores de $p = 0,0003$ e $p = 0,0000$ para MG e MR homólogos, respectivamente (com p mínimos para diferença significativa de 0,005 e 0,025 para 1% e 5% de probabilidade, respectivamente).

3.2.3 Discussão

3.2.3.1 Grupos taxonômicos de *Bacteria* encontrados em solos de mangue e marisma

Para entender o funcionamento das comunidades bacterianas e sua relação com os processos biogeoquímicos de ambientes como mangue e marisma seria necessário conhecer os processos específicos associados a cada táxon.

A seguir são descritas algumas características dos táxons encontrados nos solos de mangue e marisma.

3.2.3.1.1 *Acidobacteria*

Este filo, que possui poucos representantes isolados e caracterizados, é composto de espécies ácido-tolerantes e contém apenas três gêneros, em uma família e ordem (GARRITY; HOLT, 2001). Segundo Quaiser et al. (2003), este grupo de bactérias tem sido detectado, após o advento de técnicas moleculares, em vários ambientes, especialmente em solos, onde chegam a representar entre 30 a 50% das seqüências de uma biblioteca. Dentre os compartimentos da transeção da Ilha de Pai Matos, *Acidobacteria* foi encontrado somente no solo vegetado com *A. schaueriana* (MGAV), o qual é o menos influenciado pelas inundações das marés, por estar em um plano altimétrico superior, e que apresenta valores de pH mais baixos nas camadas superficiais (0-10 e 10-20 cm), comparado com os demais compartimentos (Ferreira, 2006). Estudos mais detalhados serão necessários para identificar se estes fatores contribuem para uma maior abundância deste grupo em solos de mangue nestas condições. Duas seqüências puderam ser classificadas como representantes da família *Acidobacteriaceae* (ordem *Acidobacteriales*).

3.2.3.1.2 *Actinobacteria*

O filo *Actinobacteria*, encontrado em todas as amostras exceto MGSP, possui uma única classe, subdividida em quatro ordens, e é reconhecido como um grupo com alta diversidade morfológica, fisiológica e genética, sendo encontrado principalmente nos solos (GARRITY; HOLT, 2001). Bactérias da ordem *Acidimicrobiales* foram encontradas apenas em MGSD, sendo uma seqüência representante do gênero *Acidimicrobium* (família *Acidimicrobiaceae*), o qual possui uma espécie (*Acidimicrobium ferrooxidans*) envolvida na oxidação de formas reduzidas de Fe. A ordem *Actinomycetales* foi encontrada em todas as amostras exceto MGSP e MRSP. Uma seqüência detectada em MGSD foi classificada como pertencentes ao gênero *Propionibacterium* (família *Propionibacteriaceae*), envolvido na degradação de celulose em solos (MARGULIS; SCHWARTZ, 1998). Uma seqüência detectada em MRZT pertence ao gênero *Sporichthya* (família *Sporichthyaceae*), também encontrada em solos (SUZUKI; OKUDA; KOMATSUBARA, 1999), mas sem função definida.

3.2.3.1.3 *Bacteroidetes*

Este filo, cujos membros podem representar entre 6% a 30% das bactérias encontradas nos oceanos (COTTRELL; KIRCHMAN, 2000; EILERS et al., 2000) e que representaram entre 10% e 20% das bactérias dos solos de mangue e marisma estudados, possui três classes: *Bacteroidetes*, *Flavobacteria* e *Sphingobacteria*. Cada uma das classes foi encontrada em pelo menos três dos seis solos estudados (Tabela 3.1). A classe *Bacteroidetes* foi encontrada em MGRZ, MRSP e MRZT. Em MGRZ não pôde ser classificada em táxons menores. Nos solos de marisma, seqüências foram classificadas até o gênero *Anaerophaga* (ordem *Bacteroidales*, família *Bacteroidaceae*), representado por bactérias anaeróbias quimiorganotróficas de metabolismo fermentativo (DENGER et al., 2002). A classe *Flavobacteria*, ubíqua em ambientes marinhos (KIRCHMAN, 2002) e que possui também importantes bactérias patogênicas de animais marinhos (LaFRENTZ et al., 2004), foi detectada em todos os solos estudados. Dentre as três famílias de sua única ordem (*Flavobacteriales*), apenas gêneros de *Flavobacteriaceae* foram detectadas. O gênero *Chryseobacterium*, encontrado não apenas em ambientes marinhos, como também em solo, água doce e alimentos (BEER et al., 2006), foi detectado em MGSD. Já o

gênero *Flavobacterium*, considerado um abundante e importante grupo envolvido na ciclagem de matéria orgânica de ambientes marinhos (VanTRAPPEN et al., 2004) foi detectado em MGSP e MRZT, enquanto que o gênero *Robiginitalea*, caracterizado recentemente (CHO; GIOVANNONI, 2004), foi detectado em MGSD, MGSP e MRZT. Bactérias da ordem *Sphingobacteriales*, única da classe *Sphingobacteria*, ubíqua em ambientes marinhos, de água doce, sedimentos e solos (LYDELL et al., 2004), foram detectadas em MGSD, MGAV e MRZT. Sequências encontradas em MGSD e MRZT foram classificadas até o gênero *Roseivirga* (família *Flexibacteraceae*), caracterizado recentemente (NEDASHKOVSKAYA et al., 2005), enquanto que uma sequência encontrada em MGSD foi classificada até o gênero *Sphingobacterium* (YABUUCHI et al., 1983).

3.2.3.1.4 *Chloroflexi*

O filo *Chloroflexi* é representado por bactérias verdes não-sulfurosas, como são classicamente chamadas, e formam um grupo complexo de bactérias recentemente reclassificadas em cinco classes (HUGENHOLTZ; STACKEBRANDT, 2004). Dessas classes apenas uma, *Anaerolineae*, que possui apenas a ordem *Anaerolineales* e a família *Anaerolineaceae*, foi detectada em MGSD, MGRZ, MGAV E MRZT (Tabela 3.1). Duas sequências encontradas em MRZT foram classificadas como pertencentes ao gênero *Anaerolinea*, descrito como sendo um grupo de bactérias anaeróbias termofílicas (SEKIGUCHI et al., 2003).

3.2.3.1.5 *Cyanobacteria*

Considerado o maior grupo taxonômico dentre as bactérias, engloba bactérias gram-negativas fotoautotróficas dotadas de dois fotossistemas (PSII e PSI), as quais utilizam o CO₂ como fonte de carbono e H₂O como agente redutor (WOESE et al., 1985; GARRITY; HOLT, 2001). Sequências representando *Cyanobacteria* foram encontradas em todos os solos estudados exceto MGRZ e MRSP, sendo que apenas em MGSD e MGSP as sequências de rDNA 16S puderam ser classificadas até gênero (*Prochlorococcus*, ordem *Prochlorales*, família *Prochlorococcaceae*). Considerados os organismos fotossintéticos de vida livre com o menor genoma até então conhecido, com 1,7 a 2,4 Mb, as espécies de *Prochlorococcus* têm distribuição

ubíqua nos ambientes marinhos e vêm sendo estudadas para um melhor entendimento das relações existentes entre as variações genéticas e de condições dos ambientes onde são encontrados (COLEMAN et al., 2006).

3.2.3.1.6 *Deferribacteria*

Este pequeno grupo, que reúne bactérias anaeróbias redutoras de Fe, Mn, S, Co e nitrato, disponíveis nos ambientes estudados, foi encontrado em todos os solos estudados exceto MGRZ e MGAV. Possui apenas uma classe e uma ordem, apresentando alguns gêneros ainda não situados em famílias definidas, como é o caso do gênero *Caldithrix* (*C. abyssi*), produtor de amônia a partir de nitrato (MIROSHNICHENKO et al., 2003), o qual foi detectado em MRSP.

3.2.3.1.7 *Firmicutes*

Neste filo, dividido em três classes, detectado em MGAV, MRSP e MRZT, estão classificadas as bactérias gram-positivas com baixa relação de G+C (GARRITY; HOLT, 2001). Segundo Desvaux (2005), 80% das bactérias celulolíticas são *Actinobacteria* ou *Firmicutes* gram-positivas, sendo as anaeróbias encontradas neste último grupo, principalmente na família *Clostridiaceae*, encontrada em MRZT (Tabela 3.1).

3.2.3.1.8 *Gemmatimonadetes*

Este filo foi originalmente proposto com base em seqüências de rDNA 16S detectadas em ambientes marinhos, sedimentos, solos e lodo industrial, existindo apenas uma espécie isolada, (*Gemmatimonas aurantiaca*), descrita como gram-negativa, aeróbia e mesofílica (ZHANG et al., 2003).

3.2.3.1.9 *Nitrospirae*

Segundo Garrity e Holt (2001), este filo, que possui apenas uma família, engloba bactérias gram-negativas metabolicamente diversificadas, sendo a maioria aeróbia quimiolitotróficas,

incluindo algumas espécies nitrificadoras e redutoras de sulfato. Representantes deste grupo foram encontrados em MGAV e MRSP (Tabela 3.1), sendo uma seqüência de MRSP classificada como *Nitrospira*, a qual desempenha importante papel no ciclo do N, realizando a oxidação do nitrito a nitrato. Segundo Kin e Kin (2006), em ambientes com concentrações elevadas de nitrito, *Nitrobacter* representa o gênero dominante, enquanto que em ambientes com concentrações mais baixas, *Nitrospira* é dominante e principal responsável pela nitrificação.

3.2.3.1.10 *Planctomycetes*

Este filo possui apenas uma família (*Planctomycetaceae*, ordem *Planctomycetales*, classe *Planctomycetacia*) e vários gêneros de importância ambiental. Um genoma completo de *Planctomycetes* (*Rhodopirellula baltica*) já foi seqüenciado (GLOCKNER et al., 2003), havendo também um projeto de sequenciamento de *Blastopirellula marina* iniciado em Fevereiro de 2006 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Muito embora *Planctomycetes* tenham sido encontrados em baixa freqüência neste estudo (Tabela 3.1), este grupo é considerado abundante em ambientes terrestres e marinhos (GLOCKNER et al., 2003). Seus representantes participam de importantes processos biogeoquímicos como os ciclos do C e N, além de apresentar características únicas como a ausência de peptidoglicano na parede celular, característica divergente daquelas de microrganismos do domínio *Bacteria*, e outras características envolvendo organização celular e composição de ácidos graxos dos fosfolipídios da parede (GLOCKNER et al., 2003). Esses microrganismos podem representar um ancestral dos atuais metanogênicos do domínio *Archaea* e metanotróficos do filo *Proteobacteria*, conferindo aos *Planctomycetes* um papel central nas transformações do ciclo do metano (CHISTOSERDOVA et al., 2004).

3.2.3.1.11 *Proteobacteria*

O Filo *Proteobacteria* é um grupo de morfologia e metabolismo muito diversificado (MARGULIS; SCHWARTZ, 1998), incluindo microrganismos autotróficos e heterotróficos aeróbios e anaeróbios. Pela elevada diversidade fisiológica, é o filo predominante em sistemas que possuam uma grande variedade de condições ambientais para o estabelecimento das populações de procariotos, como é o caso dos solos de mangue.

Subdivide-se em 5 classes: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Epsilonproteobacteria*. Todas essas classes foram encontradas em solos de mangue ou marisma (Figura 3.1).

Dentre as seis ordens da classe *Alphaproteobacteria*, as bactérias marinhas estão principalmente distribuídas em *Caulobacterales*, *Rhodobacterales* e *Sphingomonadales* (GIOVANNONI; RAPPÉ, 2000; CHO; GIOVANNONI, 20003). No presente estudo, representantes de *Rhodobacterales* e *Sphingomonadales* foram detectados (Tabela 3.1). Segundo Lee et al. (2005), *Rhizobiales*, que inclui grupos de microrganismos relacionados com o ciclo do N, encontrada em todos os solos deste estudo, é a mais heterogênea dentre as ordens de *Alphaproteobacteria*, sendo encontrada principalmente em solos e água doce, com poucos representantes em ambientes marinhos (CHO; GIOVANNONI, 2003). Esta ordem é dividida em 11 famílias (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004), das quais uma delas (*Hyphomicrobiaceae*) detectada em MGSD e MGSP. Bactérias do gênero *Filomicrobium*, encontrado em MGSP, têm sido isoladas de águas com salinidade intermediária (0,5‰ – 30‰), tipicamente encontrada em ambientes estuarinos (SCHLESNER, 1987; LEE et al., 2005). A ordem *Rhodobacterales* é dividida em duas famílias, sendo uma delas, *Rhodobacteraceae*, que possui um grande número de gêneros já caracterizados, encontrada na maioria dos solos estudados (Tabela 3.1). As seqüências representando *Rhodobacteraceae*, encontradas principalmente nos solos de marisma, foram classificadas como: *Amaricoccus*, caracterizado a partir de isolados de lodo de estação de tratamento de esgoto (MASZENAN et al., 1997); *Hyphomonas*, caracterizado pela primeira vez em 1957 e comum em ambientes marinhos e estuarinos (WEINER et al., 2000); *Roseobacter*, comum em ambientes marinhos, tem sido estudado para a produção de antibióticos (MARTENS et al., 2006); *Sulfitobacter*, encontrado em ambientes marinhos costeiros e mar aberto e participa de processos oxidativos do ciclo do enxofre (IVANOVA; FLAVIER; CHRISTEN, 2004). Em MGSD e MGRZ foram encontrados dois gêneros de bactéria que já possuem espécies com o genoma seqüenciado (GALPERIN, 2006), são eles: *Erythrobacter* e *Novosphingobium*, representantes da ordem *Sphingomonadales*, famílias *Erythrobacteraceae* e *Sphingomonadaceae*, respectivamente. Bactérias do gênero *Erythrobacter*, encontrado em MGSD, são fotoheterotróficas encontradas nos ambientes marinhos (KOBLIZEK et al., 2003), enquanto as do gênero *Novosphingobium*, encontrado em MGRZ, têm sido isoladas de solos e são consideradas importantes degradadores de hidrocarbonetos aromáticos (GALPERIN, 2006). Duas seqüências

classificadas na ordem *Rhodospirillales* foram encontradas em MRZT, sendo uma delas classificada na família *Acetobacteraceae*, de grande interesse para indústrias que utilizam processos fermentativos (JOJIMA et al., 2004). Apenas uma seqüência, encontrada em MGAV, foi classificada na ordem *Rickettsiales*, um grupo taxonômico ainda pouco consolidado (GARRITY; HOLT, 2001), representado por bactérias endossimbiontes e, por vezes, patogênicas de peixes e outros animais marinhos.

Seqüências classificadas na classe *Betaproteobacteria* foram encontradas em todos os solos exceto MGSP (Tabela 3.1). Estas puderam ser classificadas apenas no nível de família, sendo uma seqüência de MRSD classificada em *Comamonadaceae* (ordem *Burkholderiales*) e outra de MGAV em *Nitrosomonadaceae* (ordem *Nitrosomonadales*), representando duas das seis ordens de *Betaproteobacteria* (GARRITY; HOLT, 2001). Apesar de relações filogenéticas bem definidas entre seus membros, a família *Comamonadaceae* apresenta uma grande diversidade fenotípica, sendo encontradas em diferentes ambientes como solo, águas residuárias, lodo de esgoto, e ambientes contaminados com hidrocarbonetos. Essa família de bactérias, tem importante papel na biodegradação de compostos naturais ou xenobióticos, já que é capaz de utilizar uma grande variedade de substratos (WILLEMS et al., 1992). A importância da família *Nitrosomonadaceae* está no seu papel no ciclo do N, inclusive na oxidação da amônia, em sedimentos marinhos (FREITAG; PROSSER, 2004).

Segundo Garrity e Holt (2001), a taxonomia da classe *Deltaproteobacteria*, encontrada em todos os solos estudados, ainda é muito dinâmica e está susceptível a reclassificações constantes. Dentre as sete ordens desta classe, cinco foram encontradas nos solos de mangue e marisma estudados. Uma seqüência, encontrada em MRZT, foi classificada na ordem *Bdellovibrionales* (família *Bacterioviraceae*), a qual contém bactérias predadoras de bactérias gram-negativas (DAVIDOV; JURKEVITCH, 2004). *Bdellovibrionales* possui distribuição ubíqua na natureza, podendo ser encontradas em ambientes como solos, rizosfera, mares, rios, biofilmes e esgoto (WILLIAMS et al., 1995; JURKEVITCH et al., 2000). Bactérias da ordem *Myxococcales* foram encontradas em MGSP, MRSP e MRZT. Uma seqüência, encontrada em MRSP, foi classificada até no gênero *Chondromyces* (*Polyangiaceae* / *Sorangineae*), importante pela capacidade de produção de metabólitos secundários, incluindo antibióticos (JANSEN et al., 2002). Proteobactérias sulfato-redutoras, presentes em todos os solos estudados, estão distribuídas nas outras três ordens encontradas: *Desulfobacterales*, *Desulfuromonales* e

Syntrophobacterales. Três gêneros de *Desulfobacterales* foram encontrados: *Desulfosarcina* (*Desulfobacteraceae*), *Desulfobulbus* (*Desulfobulbaceae*) e *Desulforhopalus* (*Desulfobulbaceae*). A ordem *Desulfuromonadales*, encontrada em todos os solos exceto MGRZ e MRZT, teve uma seqüência classificada no gênero *Pelobacter* (*Desulfuromonaceae*), o qual também está envolvido na redução do Fe^{3+} (LOVLEY; PHILLIPS; LONERGAN, 1995). Já a ordem *Syntrophobacterales*, encontrada em todos os solos exceto MGRZ, teve uma seqüência, classificada na família *Syntrophaceae*.

A classe *Epsilonproteobacteria*, encontrada apenas nos solos de marisma, é o subgrupo de *Proteobacteria* mais recentemente definido, possuindo apenas duas famílias e uma ordem (GARRITY; HOLT, 2001). Na família *Helicobacteraceae*, os gêneros *Sulfurimonas* (detectado em MRSP e MRZT) e *Sulfurovum* (detectado em MRSP) compreendem bactérias oxidantes de enxofre (INAGAKI et al., 2003, 2004).

Bactérias da classe *Gammaproteobacteria*, encontradas com grande freqüência nos solos estudados (Tabela 3.1 e Figura 3.2), estão distribuídas em treze ordens (GARRITY; HOLT, 2001), sendo sete delas detectadas neste trabalho. Seqüências representando bactérias da ordem *Alteromonadales*, comumente isoladas de ambiente marinho (IVANOVA; FLAVIER; CHRISTEN, 2004) foram detectadas em MGSD e MRZT, sendo que algumas de MGSD foram classificadas como *Thalassomonas* (*Colwelliaceae*) e *Marinobacter* ("Incertae sedis 7"). O gênero *Thalassomonas* foi criado para situar a bactéria aeróbia estrita, halofílica e quimiorganotrófica *Thalassomonas viridans*, isolada da costa mediterrânea de Valência, Espanha (MACIÁN et al., 2001). Já *Marinobacter* é um grupo de desnitrificadores halofílicos, com várias espécies já isoladas (YOSHIE et al., 2006). A ordem *Chromatiales* engloba as bactérias fototróficas púrpuras do enxofre, caracterizadas pela formação de grumos de enxofre devido ao processo de oxidação de sulfetos e tiosulfatos (GORLENKO et al., 2004). Está subdividida nas famílias *Chromatiaceae*, encontrada somente nos solos de marisma, a qual apresenta acúmulo intracelular de enxofre, e *Ectothiorhodospiraceae*, encontrada em todos os solos, a qual apresenta acúmulo extracelular de enxofre (PRANGE et al., 2004). Seqüências encontradas em MGSD, MGRZ e MRSP puderam ser classificadas no gênero *Thioalkalispira* (*Ectothiorhodospiraceae*), recentemente caracterizado (SOROKIN et al., 2002). A presença de táxons contendo bactérias que utilizam diferentes formas de enxofre nos solos estudados sugere um importante papel das transformações deste elemento em ambientes estuarinos. Em superfície, estes processos podem

ser mais ativos e complexos do que em profundidades maiores devido à maior quantidade de fontes de energia e carbono para as bactérias sulfato-redutoras. O sulfeto produzido poderá então ser oxidado a sulfato por bactérias púrpuras do enxofre.

Bactérias metanotróficas (*Methylococcaceae*) foram encontradas em MGSD, MGRZ e MRZT, sendo uma seqüência de MGRZ classificada no gênero *Methylobacter* (BOWMAN et al., 1993). A importância ecológica dessas bactérias está no fato de elas degradarem o CH₄, um importante gás do efeito estufa. Bactérias da ordem *Oceanospirillales*, que se subdivide em duas famílias, foram detectadas em MGSD, MGSP e MRZT, sendo que em MGSD e MGSP foram detectadas seqüências que puderam ser classificadas nos gêneros *Halomonas* (*Halomonadaceae*) e *Oceanospirillum* (*Oceanospirillaceae*), os quais incluem espécies halofílicas, ubíquas em ambientes salinos (HEYRMAN et al., 2002; ROMANENKO et al., 2002; MARTÍNEZ-CÁNOVAS et al., 2004; DIMITRIU et al., 2005). Algumas espécies de *Halomonas* são importantes por produzirem exopolissacarídeos, apresentando grande potencial biotecnológico (VENTOSA; NIETO, 1995; MARGESIN; SCHINNER, 2001). O gênero *Pseudomonas* (*Pseudomonadales*, *Pseudomonadaceae*), considerado o grupo bacteriano mais diversificado e ubíquo (SPIERS; BUCKLING; RAINEY, 2000), foi detectado em MGSD, MGSP e MRSP (Tabela 3.1). O gênero *Vibrio* (*Vibrionales*, *Vibrionaceae*), um grupo bastante diverso de bactérias heterotróficas marinhas e que inclui espécies simbióticas e patogênicas (THOMPSON et al., 2004), foi detectado em MGSD, MGRZ e MGAV. Seqüências classificadas na ordem *Thiotrichales*, que também possui bactérias envolvidas na oxidação de formas reduzidas de enxofre, foram encontradas em MGRZ e MGAV.

3.2.3.2 Diversidade de *Bacteria* em solos de mangue e marisma

Os métodos baseados na análise das seqüências de rDNA 16S para estudos de diversidade de bactérias apresentam uma série de limitações, tais como o viés da PCR em favor de grupos mais dominantes, a variabilidade genética do fragmento do gene analisado e o número de seqüências analisadas em relação à riqueza de espécies, por exemplo. No entanto, são capazes de fornecer informações que outros métodos baseados em cultivo não fornecem.

Assim, apenas uma fração da diversidade existente é efetivamente analisada, e as estimativas do número de filotipos e índices de diversidade são aproximações muitas vezes

grosseiras. Isto fica mais claro se atentarmos para as grandes amplitudes dos intervalos de confiança das estimativas (Tabela 3.3).

Mesmo considerando as ressalvas apontadas, os dados obtidos mostram que a estrutura das comunidades e diversidade dos solos estudados varia em função do tipo de vegetação dominante e da posição geográfica do ambiente estuarino. Os valores de estimativa de UTOs e índices de diversidade de *Bacteria* para os solos de mangue com *S. alterniflora* (MGSP) e com *A. schauerianna* (MGAV), com menor e maior diversidade respectivamente, são estatisticamente diferentes. Da mesma forma, essas duas comunidades são significativamente diferentes (SLIBSHUFF, $P \leq 0,01$). As seqüências de rDNA 16S de *Bacteria* do solo de mangue com *A. schauerianna* (MGAV) foram classificadas em nove filos enquanto que as do solo de mangue com *S. alterniflora* foram classificadas em cinco, sendo que dois deles, *Planctomycetes* e *Deferribacteres*, só foram detectados em MGAV. Segundo Martiny et al. (2006) apesar de diferenças de diversidade entre comunidades microbianas serem reflexo da abundância relativa de táxons, podendo-se considerar inclusive a presença de um táxon em uma comunidade e sua ausência em outra, na prática ainda é impossível demonstrar conclusivamente que um táxon não está presente em um determinado ambiente ou comunidade. As estimativas da Tabela 3.3 mostram que a diversidade em MGSP não é significativamente diferente daquela estimada para MGSD. No entanto, a diversidade genética determinada pelo S-LIBSHUFF foi significativamente diferente entre essas comunidades de *Bacteria* ($P \leq 0,05$), indicando que a presença da vegetação pode influir na estrutura das comunidades de *Bacteria*, sem alterar a riqueza de espécies. Ao contrário do esperado, o sedimento sem vegetação não apresentou uma diversidade significativamente menor do que os solos com vegetação. Já, as comunidades dos solos de marisma (MRSP e MRZT), cuja distância entre os pontos amostrados é similar àquela entre os pontos de MGSP e MGSD, não apresentaram diferença significativa quando comparados pelo S-LIBSHUFF (Tabela 3.4), estando as maiores diferenças na diversidade, sendo, porém, significativamente maior em MRZT apenas para o índice de Shannon (Tabela 3.3).

Tem sido demonstrado que comunidades de microrganismos apresentam variações de abundância, distribuição e diversidade em variadas escalas espaciais e taxonômicas, devido à influência de uma grande quantidade de fatores bióticos e abióticos (MARTINY et al., 2006). Estudando as variações de abundância e estrutura das comunidades de *Bacteria* na margem de canal de “salt marsh” e sedimento adjacente, Franklin et al. (2002) encontraram variações

espaciais na escala de algumas dezenas de centímetros, sendo estas mais correlacionadas com a variação fisiográfica vertical na margem, onde existe maior variação de potencial redox devido ao regime de inundação e drenagem, do que com a variação horizontal no sedimento adjacente. Diferenças de localização fisiográfica vertical (elevação), que variaram de 0 a 40 cm entre os compartimentos do presente estudo, pode ser um importante fator na determinação das comunidades de *Bacteria* por definirem os regimes de inundação e conseqüentemente as variações de condições de oxi-redução.

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que as comunidades de *Bacteria* dos compartimentos de mangue variam em escala espacial relativamente reduzida, assim como variam os valores de atributos edáficos como pH, Eh, C da biomassa microbiana, massa de raízes, porcentagem de areia, carbono orgânico, S, Fe e Mn totais, concentrações das frações AVS, HS⁻, Fe reativo e Fe pirítico e grau de piritização (FERREIRA, 2006). Estas variações devem ser consideradas, assim como as citadas anteriormente relacionadas à vegetação e posição fisiográfica, como fatores que podem influir na definição da distribuição da diversidade bacteriana. Porém os dados não nos dão subsídios para propormos quais são os eventos responsáveis pela definição das estruturas e diversidade destas comunidades, considerando que os solos de mangue e marisma possuem uma dinâmica biogeoquímica complexa, influenciada pela variação características edáficas, fisiográficas, climáticas, de fauna e vegetação (MARCHAND et al., 2004). Ferreira (2006) não encontrou entre os dados dos atributos edáficos, correlações suficientes para estabelecer uma relação entre as características edáficas e a zonação responsável pela consolidação dos diferentes compartimentos de vegetação da transição estudada.

Uma hipótese a ser considerada é que variações de características edáficas, de vegetação e clima podem estar atuando estruturação das comunidades de *Bacteria* nos solos de mangue e marisma, enquanto que a variação de diversidade entre as comunidades dos solos de mangue e marisma pode estar sendo definida pelo isolamento geográficos desses ambientes. Segundo Martiny et al. (2006), a biogeografia dos microrganismos (distribuição espacial e temporal da biodiversidade) é definida por dois conjuntos de fatores, um referente a aspectos “contemporâneos” como variações de condições ambientais e outro a aspectos “históricos” como o isolamento continental. Em uma abordagem teórica, baseada em estudos prévios de biogeografia de plantas, propõem que o ambiente influenciado pelos mesmos eventos históricos representa uma “província” e que o ambiente influenciado pelos mesmos eventos

contemporâneos representa um “habitat”, e levantam quatro hipóteses para a definição da diversidade das comunidades de microrganismos nos ambientes. Na hipótese nulidade, os microrganismos estariam distribuídos aleatoriamente, existindo assim um habitat e uma província. A segunda hipótese considera que a biogeografia dos microrganismos reflete as variações ambientais contemporâneas, definindo vários habitats em uma única província. Na terceira hipótese, toda a variação espacial seria definida pelos efeitos dos eventos históricos, existindo assim várias províncias e um único habitat. A última hipótese considera que a diversidade das comunidades é definida tanto pelos eventos históricos quanto pelas condições ambientais contemporâneas, existindo assim vários habitats e províncias. Definidas estas possibilidades, levantam duas importantes questões: 1 – comunidades microbianas de diferentes locais possuem diferenças de diversidade?; 2 – se possuem, isto se deve a fatores ambientais contemporâneos, eventos históricos ou ambos?

Os resultados deste trabalho indicam que as diferenças de diversidade de *Bacteria* em ambientes estuarinos existem, e que tanto fatores históricos como contemporâneos podem estar influenciando na determinação da sua variação.

As metodologias para a mensuração e comparação de diversidade microbiana começaram a ser propostas nos últimos anos. Porém, só estudos mais aprofundados é que irão permitir o melhor entendimento das relações entre microrganismos e características ambientais, o conhecimento dos fatores mais importantes na determinação das estruturas das comunidades, além do desenvolvimento de melhores metodologias para os próprios estudos de diversidade.

3.3 Conclusões

Os solos de mangue apresentam variações de diversidade de *Bacteria*, sendo a diferença mais pronunciada encontrada entre os solos com *Spartina alterniflora* e *Avicennia schauerianna*.

Os solos de marisma com *Spartina maritima* e *Zostera noltii* não apresentaram diferenças significativas de diversidade.

Solos de mangue e marisma possuem diferenças de diversidade das comunidades de *Bacteria*.

As variações de diversidade de *Bacteria* encontradas nos ambientes estuarinos podem estar sendo condicionadas por tanto por fatores históricos como contemporâneos.

Grupos taxonômicos de *Bacteria* detectados nos solos de mangue e marisma estão relacionados com processos biogeoquímicos de ambientes estuarinos.

Os solos de mangue e marisma apresentam grande potencial para a bioprospecção de bactérias para uso biotecnológico.

Referências

- BEER, H.; HUGO, C.J.; JOOSTE, P.J.; VANCANNEYT, M.; COENYE, T.; VANDAMME, P. *Chryseobacterium pscium* sp. nov., isolated from fish of the South Atlantic Ocean off South Africa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 56, p. 1317-1322, 2006.
- BOWMAN, J.P.; SLY, L.I.; NICHOLS, P.D.; HAYWARD, A.C. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 43, p. 735-753, 1993.
- BURNS, B.P.; GOH, F.; ALLEN, M.; NEILAN, B.A. Microbial diversity of extant stromatolites in the hypersaline marine environment of Shark Bay, Australia. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1096-1101, 2004.
- CHISTOSERDOVA, L.; JENKINS, C.; KALYUZHNYAYA, M.G.; MARX, C.J.; LAPIDUS, A.; VORHOLT, J.A.; STALEY, J.T.; LIDSTROM, M.E. The enigmatic *Planctomycetes* may hold a key to the origins of methanogenesis and methylotrophy. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 21, p. 1234-1241, 2004.
- CHO, J.; GIOVANNONI, S.J. *Fulvimarina pelagi* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium that forms a deep evolutionary lineage of descent in the order 'Rhizobiales'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 53, p. 1853-1859, 2003.
- CHO, J.; GIOVANNONI, S.J. *Robiginitalea biformata* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium in the family Flavobacteriaceae with a higher C+C content. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 1101-1106, 2004.
- CHOUARI, R.; LePASLIER, D.; DAEGELEN, P.; GINESTET, P.; WEISSENBAACH, J.; SGHIR, A. Molecular evidence for novel planctomycete diversity in a municipal wastewater treatment plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7354-7363, 2003.
- COLEMAN, M.L.; SULLIVAN, M.B.; MARTINY, A.C.; STEGLICH, C.; BARRY, K.; DeLONG, E.F.; CHISHOLM, S.W. Genomic islands and the ecology and evolution of *Prochlorococcus*. **Science**, Washington v. 311, p. 1768-1770, 2006.

COTTRELL; KIRCHMAN, D. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 1692-1697, 2000.

CURTIS, T.P.; SLOAN, W.T.; SCANNELL, J.W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 10494-10499, 2002.

DABERT, P.; DELGENES, J.P.; GODON, J.J. Monitoring the impact of bioaugmentation on the start up of biological phosphorus removal in a laboratory scale activated sludge ecosystem. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 66, p. 575-588, 2005.

DAVIDOV, Y.; JURKEVITCH, E. Diversity and evolution of Bdellovibrio-and-like organisms (BALOs), reclassification of *Bacteriovorax starrii* as *Peredibacter starrii* gen. nov., comb. nov., and description of the Bacteriovorax-Peredibacter clade as *Bacteriovoracaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 1439-1452, 2004.

DENGER, K.; WARTHMAN, R.; LUDWIG, W.; SCHINK, B. *Anaerophaga thermohalophila* gen. nov., sp. Nov., a moderately thermohalophilic, strictly anaerobic fermentative bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 52, p. 173-178, 2002.

DESVAUX, M.I. *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam v. 29, p. 741-764, 2005.

DIMITRIU, P.A.; SHUKLA, S.K.; CONRADT, J.; MÁRQUEZ, M.C.; VENTOSA, A.; MAGLIA, A.; PEYTON, B.M.; PINKART, H.C.; MORMILE, M.R. Nitrocola lacisaponensis gen. nov., sp. nov., a novel alkaliphilic bacterium isolated from an alkaline, saline lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 55, p. 2273-2278, 2005.

DONG, H.; ZHANG, G.; JIANG, H.; YU, B.; CHAPMAN, L.R.; LUCAS, C.R.; FIELDS, M.W. Microbial diversity in sediments of saline Qinghai Lake, China: linking geochemical controls to microbial ecology. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, p. 65-82, 2006.

EILERS, H.; PERNTHALER, J.; GLOCKNER, F.O.; AMANN, R. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3044-3051, 2000.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

FERREIRA, T.O. **Processos pedogenéticos e biogeoquímica de Fe e S em solos de manguezais**. 2006. 141 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

- FRANKLIN, R.B.; BLUM, L.; McCOMB, A.C.; MILLS, A.L. A geostatistical analysis of small-scale spatial variability in bacterial abundance and community structure in salt marsh creek bank sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 42, p. 71-80, 2002.
- FREITAG, T.E.; PROSSER, J.I. Differences between Betaproteobacterial ammonia-oxidizing communities in marine sediments and those in overlying water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 3789-3793, 2004.
- FRIAS-LOPEZ, J.; ZERKLE, A.L.; BONHEYO, G.T.; FOUKE, B.W. Partitioning of bacterial communities between seawater and black band diseased, and dead coral surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 2214-2228, 2002.
- GALPERIN, M.Y. Genomes to aid in bioremediation of dry cleaning solvents, mothballs and more. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 949-955, 2006.
- GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. **Taxonomic outline of the Prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology**, 2nd ed. Release 5.0. New York: Springer, 2004, <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline>.
- GARRITY, G.M.; HOLT, J.H. A road map to the manual. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, G.M.; GARRITY (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed., v. 1. Berlin: Springer-Verlag KG, 2001. p. 119-166.
- GETTER, C.D.; CINTRON, G.; DICKS, B.; LEWIS, R.R.; SENECA, E.D. The recovery and restoration of salt marshes and mangrove following an oil spill. In: CAIRNS, J.; BUIKEMA, A.L. (Ed.) **Restoration of habitats impacted by oil spills**. Boston: Butterworth, 1984, chap. 3, p.65-113.
- GIOVANNONI, S.J.; RAPPÉ, M.S. Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. In: KIRCHMAN, D.L. (Ed.). **Microbial ecology of the oceans**. New York: Wiley-Liss, 2000. p.47-84.
- GLEASON, S.M.; EWEL, K.C.; HUE, N. Soil redox conditions and plant-soil relationships in a micronesian mangrove forest. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, London, v. 56, p. 1065-1074, 2003.
- GLOCKNER, F.O.; KUBE, M.; BAUER, M.; TEELING, H.; LOMBARDOT, T.; LUDWIG, W.; GADE, D.; BECK, A.; BORZYM, K.; HEITMANN, K.; RABUS, R.; SCHLESNER, H.; AMANN, R.; REINHARDT, R. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 8298-8303, 2003.
- GORLENKO, V.M. BRYANTSEVA, I.A.; PANTELEEVA, E.E.; TOUROVA, T.P. KOLGANOVA, T.V.; MAKHNEVA, Z.K.; MOSKALENKO, A.A. *Ectothiorhodosinus mongolicum* gen. nov., sp. nov., a new purple bacterium from a soda lake in Mongolia. **Microbiology**, New York, v. 73, p. 66-73, 2004.

GREMION, F.; CHATZINOTAS, A.; HARMS, H. Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy-metal contaminated bulk and rhizosphere soil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 896-907, 2003.

HEYRMAN, J.; BALCAEN, A.; DeVOS, P.; SWINGS, J. *Halomonas muralis*, sp. nov., isolated from microbial biofilms colonizing the walls and murals of the Saint-Catherine chapel (Castle Herberstein, Austria). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 52, p. 2049-2054, 2002.

HUANG, L.N.; ZHU, S.; ZHOU, H.; QU, L.H. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with the leachate of a closed municipal solid waste landfill. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 242, p. 297-303, 2005.

HUGENHOLTZ, P.; STACKEBRANDT, E. Reclassification of *Sphaerobacter thermophilus* from the subclass *Sphaerobacteridae* in the phylum *Actinobacteria* to the class *Thermomicrobia* (emended description) in the phylum *Chloroflexi* (emended description). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 2049-2051, 2004.

HUGENHOLTZ, P.; PITULLE, C.; HERSHBERGER, K.L.; PACE, N.R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 366-376, 1998.

INAGAKI, F.; NUNOURA, T.; NAKAGAWA, S.; TESKE, A.; LEVER, M.; LAUER, A.; SUZUKI, M.; TAKAI, K.; DELWICHE, M.; COLWELL, F.S.; NEALSON, K.H.; HORIKOSHI, K.; D'HONDT, S.; JORGENSEN, B.B. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 2815-2820, 2006.

INAGAKI, F.; TAKAI, K.; KOBAYASHI, H.; NEALSON, K.H.; HORIKOSHI, K. *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing e-proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa trough. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 53, p. 1801-1805, 2003.

INAGAKI, F.; TAKAI, K.; NEALSON, K.H.; HORIKOSHI, K. *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the e-Proteobacteria isolated from Okinawa trough hydrothermal sediments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 1477-1482, 2004.

IVANOVA, E.P.; FLAVIER, S.; CHRISTEN, R. Phylogenetic relationships among marine Alteromonas-like proteobacteria: emended description of the family Alteromonadaceae and proposal of Pseudoalteromonadaceae fam. nov., Colwelliaceae fam. nov., Shewanellaceae fam. nov., Moritellaceae fam. nov., Ferrimonadaceae fam. nov., Idiomarinaceae fam. nov. and Psychromonadaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 1773-1788, 2004.

JANSEN, R.; KUNZE, B.; REICHENBACH, H.; HOFLE, G. The ajudazols A and B, novel isochromanones from *Chondromyces crocatus* (Myxobacteria): isolation and structure elucidation. **European Journal of Organic Chemistry**, Weinheim, v. 5, p. 917-921, 2002.

JOJIMA, Y.; MIHARA, Y.; SUZUKI, S.; YOKOZEKI, K.; YAMANAKA, S.; FUDOU, R. *Saccharibacter floricola* gen. nov., sp. nov., a novel osmophilic acetic acid bacterium isolated from pollen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 2263-2267, 2004.

JURKEVITCH, E.; RAMATI, B. Design and uses of *Bdellovibrio* 16S rRNA-targeted oligonucleotides. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 184, p. 265-271, 2000.

KIM, B.S.; OH, H.M.; KANG, H.; PARK, S.S.; CHUN, J. Remarkable bacterial diversity in the tidal sediment as revealed by 16S rDNA analysis. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 14, p. 205-211, 2004.

KIM, D.; KIM, S. Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitrification reactor systems and their kinetic characteristics. **Water Research**, Oxford, v. 40, p. 887-894, 2006.

KIRCHMAN, D.L. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 30, p. 91-100, 2002.

KNITTEL, K.; BOETIUS, A.; LEMKE, A.; EILERS, H.; LOCHTE, K.; PFANNKUCHE, O.; LINKE, P. AMANN, R. Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia Margin, Oregon). **Geomicrobiology Journal**, Philadelphia, v. 20, p. 269-294, 2003.

KOBLIZEK, M.; BEJA, O.; BIDIGARE, R.R.; CHRISTENSEN, S.; BENITEZ-NELSON, B.; VETRIANI, C.; KOLBER, M.K.; FALKOWSKI, P.G.; KOLBER, Z.S. Isolation and characterization of *Erythrobacter* sp. strains from the upper ocean. **Archives of Microbiology**, New York, v. 180, p. 327-338, 2003.

KRISTENSEN, E.; ANDERSEN, F.O.; HOLMBOE, N.; HOLMER, M.; THONGTHAM, N. Carbon and nitrogen mineralization in sediments of the Bangrong mangrove area, Phuket, Thailand. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf Luhe, v. 22, p. 199-213, 2000.

LaFRENTZ, B.R.; LaPATRA, S.E.; JONES, G.R.; CAIN, K.D. Protective immunity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following immunization with distinct molecular mass fractions isolated from *Flavobacterium Psychrophilum*. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf Luhe, v. 59, p. 17-26, 2004.

LEE, K.; LIU, C.; ANZAI, Y.; KIM, H.; AONO, T.; OYAIZU, H. The hierarchical system of the 'Alphaproteobacteria': description of *Hyphomonadaceae* fam. nov., *Xanthobacteraceae* fam. nov. and *Erythrobacteraceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 55, p. 1907-1919, 2005.

- LEY, R.E.; HARRIS, J.K.; WILCOX, J.; SPEAR, J.R.; MILLER, S.R.; BEBOUT, B.M.; MARESCA, J.A.; BRYANT, D.A.; SOGIN, M.L.; PACE, N.R. Unexpected diversity and complexity of the Gerrero Negro hypersaline microbial mat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 3685-3695, 2006.
- LILES, M.R.; MANSKE, B.F.; BINTRIM, S.B.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 2684-2691, 2003.
- LI, L.; KATO, C.; HORIKOSHI, K. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 8, p. 659-677, 1999.
- LOPEZ-GARCIA, P.; DUPERRON, S.; PHILIPPOT, P.; FORIEL, J.; SUSINI, J.; MOREIRA, D. Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 961-976, 2003.
- LOVLEY, D.R.; PHILLIPS, E.J.P.; LONERGAN, D.J. Fe(III) and SO reduction by *Pelobacter carbinolicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 2132-2138, 1995.
- LYDELL, C.; DOWELL, L.; SIKAROODI, M.; GILLEVET, P.; EMERSON, D. A population survey of members of the phylum *Bacteroidetes* isolated from salt marsh sediments along the east coast of the United States. **Microbial Ecology**, New York, v. 48, p. 263-273, 2004.
- MACIAN, M.C.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H.; GARAY, E.; PUJALTE, M.J. *Thalassomonas viridans* gen. nov., sp. nov., a novel marine c-proteobacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 51, p. 1283-1289, 2001.
- MARCHAND, C.; BALTZER, F.; LALLIER-VERGÈS, E.; ALBÉRIC, P. Pore-water chemistry in mangrove sediments: Relationship with species composition and developmental stages (French Guiana) **Marine Geology**, Amsterdam, v. 208, p. 361-381, 2004.
- MARCHESI, J.R.; TAKUICHI, S.; WEIGHTMAN, A.J.; MARTIN, T.A.; FRY, J.C.; HIOM, S.J.; WADE, W.G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 795-799, 1998.
- MARGESIN, R.; SHINNER, F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. **Extremophiles**, Tokyo, v. 5, p. 75-83, 2001.
- MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K.V. **Five Kingdoms**: an illustrated guide to the phyla of life on earth, 3rd ed. New York: WH Freeman., 1998. 520p.

MARTENS, T.; HEIDORN, T.; PUKALL, R.; SIMON, M.; TINDALL, B.J.; BRINKHOFF, T. Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte et al. 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay et al. 1995) Uchino et al. 1999 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisingera*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 56, p. 1293-1304, 2006.

MARTÍNEZ-CÁNOVAS, M.J.; QUESADA, E.; LLAMAS, I.; BÉJAR, V. *Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 733-737, 2004.

MARTINY, J.B.H.; BOHANNAN, B.J.M.; BROWN, J.H.; COLWELL, R.K.; FUHRMAN, J.A.; GREEN, J.L.; HORNER-DEVINE, M.C.; KANE, M.; KRUMINS, J.A.; KUSKE, C.R.; MORIN, P.J.; NAEEM, S.; ØVREÅS, L.; REYSENBACH, A.; SMITH, V.H.; STALEY, T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature**, London, v. 4, p. 102-112, 2006.

MASZENAN, A.M.; SEVIOUR, R.J.; PATEL, B.K.C.; REES, G.N.; McDOUGALL, B.M. *Amaricoccus* gen. nov., a gram-negative coccus occurring in regular packages or tetrads, isolated from activated sludge biomass, and descriptions of *Amaricoccus veronensis* sp. nov., *Amaricoccus tamworthensis* sp. nov., *Amaricoccus macauensis* sp. nov., and *Amaricoccus kaplicensis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 47, p. 727-734, 1997.

McLUSKY, D.S.; ELLIOT, M. **The estuarine ecosystem: Ecology, threats, and management.** Oxford: Oxford University Press, 2004. 214 p.

MIROSHNICHENKO, M.L.; KOSTRIKINA, N.A.; CHERNYH, N.A.; PIMENOV, N.V.; TOUROVA, T.P.; ANTIPOV, A.N.; SPRING, S.; STACKEBRANDT, E.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E.A. *Caldithrix abyssi* gen. nov., sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic, anaerobic bacterium isolated from a mid-atlantic ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 53, p. 323-329, 2003.

NAKAGAWA, S.; TAKAI, K.; INAGAKI, F.; CHIBA, H.; ISHIBASHI, J.; KATAOKA, S.; HIRAYAMA, H.; NUNOURA, T.; HORIKOSHI, K.; SAKO, Y. Variability in microbial community and venting chemistry in a sediment-hosted backarc hydrothermal system: Impacts of seafloor phase-separation. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 54, p. 141-155, 2005.

NEDASHKOVSKAYA, O.I.; KIM, S.B.; LEE, D.H.; LYSSENKO, A.M.; SHEVCHENKO, L.S.; FROLOVA, G.M.; MIKHAILOV, V.V.; LEE, K.H.; BAE, K.S. *Roseivirga ehrenbergii* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the phylum 'Bacteroidetes', isolated from the green alga *Ulva fenestrata*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 55, p. 231-234, 2005.

NERCESSIAN, O.; FOUQUET, Y.; PIERRE, C.; PRIEUR, D.; JEANTHON, C. Diversity of Bacteria and Archaea associated with a carbonate-rich metalliferous sediment sample from the Rainbow vent field on the Mid-Atlantic Ridge. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 698-714, 2005.

NIELSEN, O.I.; KRISTENSEN, E.; MACINTOSH, D.J. Impact of fiddler crabs (*Uca* spp.) on rates and pathways of benthic mineralization in deposited mangrove shrimp pond waste. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 289, p.59-81, 2003.

MUSAT, N.; WERNER, U.; KNITTEL, K.; KOLB, S.; DODENHOF, T.; VanBEUSEKOM, J.E.; de BEER, D.; DUBILIER, N.; AMANN, R. Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Romo basin, Wadden Sea. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 29, p. 333-348, 2006.

ØVREÅS, L.; TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p 303–315, 1998.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L. TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

POLYMENAKOU, P.N.; BERTILSSON, S.; TSELEPIDES, A.; STEPHANOU, E.G. Bacterial community composition in different sediments from the Eastern Mediterranean Sea: a comparison of four 16S ribosomal DNA clone libraries. **Microbial Ecology**, New York, v. 50, p. 447-462, 2005.

PRANGE, A.; ENGELHARDT, H.; TRUPER, H.G.; DAHL, C. The role of the sulfur globule proteins of *Allochromatium vinosum*: mutagenesis of the sulfur globule protein genes and expression studies by real-time RT-PCR. **Archives of Microbiology**, New York, v. 182, p. 165-174, 2004.

QUAISER, A.; OCHSENREITER, T.; LANZ, C.; SCHUSTER, S.; TREUSCH, A.H.; ECK, J.; SCHLEPER, C. Actidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 50, p. 563-575, 2003.

ROMANENKO, L.A.; SCHUMANN, P.; ROHDE, M.; MIKHAILOV, V.V.; STACKEBRANDT, E. *Halomonas halocynthiae* sp. nov., isolated from the marine acidian *Halocynthia aurantium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 52, p. 1767-1772, 2002.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 25, p. 39-67, 2001.

- SCHLESNER, H. *Filomicrobium fusiforme* gen. nov., sp. nov., a slender budding, hyphal bacterium from brackish water. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 10, p. 63-67, 1987.
- SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing to DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Os Manguezais de Cananéia (25°S, Brasil). II - Um projeto integrado para avaliação do Ecossistema/Estrutura. **Revista Atlântica**, Rio Grande, v. 2, n. 5, p. 108, 1982.
- SEKIGUCHI, Y.; YAMADA, T.; HANADA, S.; OHASHI, A.; HARADA, H.; KAMAGATA, Y. *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage for the domain *Bacteria* at the subphylum level. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 53, 1843-1851, 2003.
- SHAEFFER-NOVELLI, Y.; MESQUITA, H. S. L.; CINTRON-MOLERO, G. The Cananéia lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil. **Estuaries**, Columbia, v. 13, p. 193-203, 1990.
- SHERMAN, R.E.; FAHEY, T.J.; HOWARTH, R.W. Soil-plant interactions in a neotropical mangrove forest: iron, phosphorus and sulfur dynamics. **Oecologia**, Berlin, v. 115, p. 553-563, 1998.
- SHRIADAH, M.M.A. Heavy metals in mangrove sediments of the United Arab Emirates shoreline (Arabian Gulf). **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 116, p. 523-534, 1999.
- SINGLETON, D.R.; FURLONG, M.A.; RATHBUN, S.L.; WHITMAN, W.B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4374-4376, 2001.
- SORENSEN, K.B.; CANFIELD, D.E.; TESKE, A.P. OREN, A. Community composition of a hypersaline endoevaporitic microbial mat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 7352-7365, 2005.
- SOROKIN, D.Y.; TOUROVA, T.P.; KOLGANOVA, T.V.; SJOLLEMA, K.A.; KUENEN, G. *Thioalkalispira microaerophila* gen., nov., sp. nov., a novel lithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from a soda lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 52, p. 2175-2182, 2002.
- SPIERS, A.J.; BUCKLING, A.; RAINEY, P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**, New York, v. 146, p. 2345-2350, 2000.
- SUZUKI, S.; OKUDA, T.; KOMATSUBARA, S. Selective isolation and distribution of *Sporichthya* strains in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1930-1935, 1999.

TESKE, A.; HINRICHS, K.U.; EDGCOMB, V.; GOMEZ, A.V. KYSELA, D.; SYLVA, S.P.; SOGIN, M.L.; JANNASCH, H.W. Evidence for anaerobic methanotrophic communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1994-2007, 2002.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

THOMPSON, J.R.; RANDA, M.A.; MARCELINO, L.A.; TOMITA-MITCHELL, A.; LIM, E.; POLZI, M.F. Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 4103-4110, 2004.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, p.240-245, 2002.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 78-87, 1990.

VanTRAPPEN; S.; VANDECANDELAERE, I.; MERGAERT, J.; SWINGS, J. *Flavobacterium degerlachei* sp. nov., *Flavobacterium frigoris* sp. nov. and *Flavobacterium micromati* sp. nov., novel psychrophilic bacteria isolated from microbial mats in Antarctic lakes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 85-92, 2004.

VENTOSA, A.; NIETO, J.J. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 11, p. 85-94.

WEINER, R.M.; MELICK, M.; O'NEILL, K.; QUINTERO, E. *Hyphomonas adhaerens* sp. nov., *Hyphomonas johnsonii* sp. nov. and *Hyphomonas rosenbergii* sp. nov., marine budding and prosthecate bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 50, p. 459-469, 2000.

WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WILLEMS, A.; DeVOS, P.; DeLEY, J. The genus *Comamonas*. In: BALOWS, A.; TRUPER, G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. **The prokaryotes** 2nd, v. 3. New York: Springer, 2003. p. 2583-2590.

WILLIAMS, H.N.; SCHEOFFIELD, A.J.; GUETHER, D.; KELLEY, J.; SHAN, D.; FALKER, W.A. Recovery of bdellovibrios from submerged surfaces and other aquatic habitats. **Microbial Ecology**, New York v. 29, p. 39-48, 1995.

- WOBUS, A.; BLEUL, C.; MAASSEN, S.; SCHEERER, C.; SCHUPPLER, M.; JACOBS, E.; ROSKE, I. Microbial diversity and functional characterization of sediments from reservoirs of different trophic state. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 46, p. 331-347, 2003.
- WOESE, C.R.; STACKEBRANDT, E.; MACKE, T.J.; FOX, G.E. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 6, p. 143-151, 1985.
- WONG, M.T.; TAN, F.M.; NG, W.J.; LIU, W.T. Identification and occurrence of tetrad-forming Alphaproteobacteria in anaerobic-aerobic activated sludge processes. **Microbiology**, New York, v. 150, p. 3741-3748, 2004.
- YABUUCHI, E.; KANEKO, T.; YANO, I.; MOSS, C.W.; MIYOSHI, N. *Sphingobacterium* gen. nov., *Sphingobacterium spiritivorum* comb. nov., *Sphingobacterium mizutae* sp. nov., and *Flavobacterium indologenes* sp. nov.: glucose-nonfermenting Gram-negative rods in DCD groups I1K-2 and I1b. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 33, p. 580-598, 1983.
- YAKIMOV, M.M.; DENARO, R.; GENOVESE, M.; CAPPELLO, S.; D'AURIA, G.; CHERNIKOVA, T.N.; TIMMIS, K.N.; GOLYSHIN, P.N.; GIULIANO, L. Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 1426-1441, 2005.
- YANAGIBAYASHI, M.; NOGI, Y.; LI, L.; KATO, C. Changes in the microbial community in Japan Trench sediment from a depth of 6292m during cultivation without decompression. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 170, p. 271-279, 1999.
- YOSHIE, S.; OGAWA, T.; MAKINO, H.; HIROSAWA, H.; TSUNEDA, S.; HIRATA, A. Characteristics of bacteria showing high denitrification activity in saline wastewater. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, p. 277-283, 2006.
- ZHANG, H.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; HUGENHOLTZ, P.; KIM, H.; KAMAGATA, Y.; NAKAMURA, K. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 53, p. 1155-1163, 2003.

4 ESTRUTURA DAS COMUNIDADES DE PROCARIOTOS E DIVERSIDADE DE ARCHAEA EM UM PERFIL DE SEDIMENTO DE CANAL DE MANGUE

Resumo

Estrutura das comunidades de procariotos e diversidade de *Archaea* em um perfil de sedimento de canal de mangue

Nos últimos anos, estudos têm demonstrado que organismos do domínio *Archaea* habitam muitos ambientes além dos de condições extremas onde foram encontrados primeiramente. Sabe-se que sedimentos marinhos e estuarinos comportam uma grande diversidade de *Archaea*. Estudos de variação de estrutura de comunidade de procariotos e diversidade de *Archaea* em sedimentos de mangue são escassos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variação das estruturas das comunidades de procariotos bem como a diversidade de *Archaea* em um perfil de sedimento de mangue. Amplicons de rDNA 16S de *Bacteria* e *Archaea* de amostras de cada 10 cm até 120 cm de um perfil de sedimento do leito de um canal de mangue foram analisadas em DGGE. Amplicons de rDNA 16S de *Archaea* das subamostras das camadas de 10-20 cm e 90-100 cm foram seqüenciados. *Bacteria* foi detectada até a subamostra da camada de 60-70 cm, enquanto que *Archaea* foi detectada até 120 cm. As maiores alterações das estruturas das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* foram detectadas a partir da subamostra da camada de 20-30 cm e 60-70 cm, respectivamente. O sedimento apresentou grande redução do teor total de C a partir da subamostra da camada de 80-100 cm. Há predomínio de *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota* nas camadas de 10-20 cm e 90-100 cm, respectivamente. A análise com o S-LIBSHUFF mostrou que as comunidades de *Archaea* das subamostras das camadas de 10-20 cm e de 90-100 cm são estatisticamente diferentes. Os valores calculados pelo estimador não-paramétrico Chao1 indicam maior riqueza de número de filotipos de *Archaea* na subamostra da camada de 90-100 cm. Conclui-se que: as estruturas das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* variaram significativamente ao longo do perfil estudado; na camada mais superficial do sedimento de mangue estudado predomina *Euryarchaeota* metanogênicas enquanto que na camada mais profunda predomina *Crenarchaeota*; as variações de estruturas de comunidades e de diversidade encontradas podem estar relacionadas com alterações de teores de elementos, especialmente C.

Palavras-chave: mangue; sedimento; diversidade microbiana; microrganismos; *Archaea*; rDNA 16S; DGGE.

Abstract

Structure of procaryotic communities and archaeal diversity in a mangrove sediment profile

In the last years, studies has been demonstrated that *Archaea* may be found in many environments apart from those of extreme conditions, where they was firstly found. It's known that marine and estuarines sediments carry out a great diversity of *Archaea*. Studies of variation of prokaryotes community structures and diversity of *Archaea* in mangrove sediments are scarce. The aim of this work was to evaluate the variation of prokaryotes community structures and diversity of *Archaea* in one mangrove sediment profile. 16S rDNA amplicons of samples of each 10 cm until 120 cm of a profile of mangrove canal sediment was analyzes using DGGE. *Archaea* 16S rDNA amplicons of the sub samples of the layers between 10-20 cm and 90-100 cm was sequenced. *Bacteria* was detected until sample 60-70 cm, whereas *Archaea* was detected until 120 cm. The major variations of the *Bacteria* and *Archaea* community structures was detected in the sample start from layer of 20-30 cm and 60-70 cm, respectively. The sediment showed great reduction of the content of C in the sample of 80-100 cm. It has dominance of *Euryarchaeota* and *Crenarchaeota* in the layers of 10-20 cm and 90-100 cm, respectively. The analyses with the S-LIBSHUF revealed that the *Archaea* communities in the 10-20 cm and 90-100 cm samples are statistically different. The values calculate by non-parametric estimator Chao-1 revealed more numbers of phylotypes of *Archaea* present in the sample 90-100 cm. We conclude that the *Bacteria* and *Archaea* community structure changes significantly in the profile studied. Methanogenic *Euryarchaeota* was found specially in the upper sample of mangrove sediment analysed whereas the *Crenarchaeota* was found specially in the lower. The variation of community structures and diversity could be related to variations in the content of elements, especially C.

Keywords: mangrove; sediment; microbial diversity; microorganisms; *Archaea*; 16S rDNA; DGGE.

4.1 Introdução

Os microrganismos representam as formas de vida mais abundantes e diversificadas do planeta, detendo a maior proporção da diversidade genética existente (LAMBAIS et al., 2005). Segundo estimativas de Whitman; Coleman e Wiebe (1998), aproximadamente 4,5 a 6,5% dos procariotos ocorrem na superfície de ambientes terrestres, 2 a 3% nas águas dos oceanos e a vasta maioria em sub-superfície (abaixo de 8 cm em ambientes terrestres e 10 cm em sedimentos marinhos). A maior parte das espécies permanece desconhecida, já que as pesquisas têm dispensado maior atenção aos microrganismos presentes na superfície dos ambientes terrestres (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998; ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001).

Tem sido demonstrado que os solos e sedimentos de ecossistemas estuarinos representam grandes bancos genéticos, contendo grande diversidade de microrganismos ainda não estudados (POLYMENAKOU et al., 2005; MARTINY et al., 2006), cuja caracterização genética e funcional será fundamental para o melhor entendimento dos importantes processos biogeoquímicos destes ambientes, assim como para a descoberta de novos genes e processos metabólicos com potencial de uso biotecnológico.

Dentre os microrganismos que habitam ambientes estuarinos devemos considerar os do domínio *Archaea* em função das características anaeróbias e concentração de sais nos mesmos (BUCKLEY; GRABER; SCHMIDT, 1998). Apesar de pouco se saber sobre as funções que as arqueas desempenham nos ambientes onde são encontradas, alguns grupos são relevantes para o ciclo do C, como é o caso dos metanogênicos (KOTSYURBENKO et al., 2004; GALAND et al., 2005; CADILLO-QUIROZ et al., 2006).

Técnicas moleculares baseadas na análise do DNA extraído diretamente do ambiente têm facilitado estudos de caracterização da diversidade das comunidades microbianas, necessários para o entendimento dos processos biogeoquímicos ou para utilização biotecnológica (BENLLOCH; MARTINEZ-MURCIA; RODRIGUEZ-VALERA, 1995; LAMBAIS et al., 2005). Aliadas aos avanços da bioinformática e dos métodos de análise estatística, estas técnicas têm se mostrado cada vez mais promissoras para estudos de diversidade microbiana em diferentes ambientes (TORSVIK; ØVREÅS, 2002). Estudos de caracterização de estrutura de comunidades de procariotos podem ser feitos utilizando-se a variabilidade nas sequências do rDNA 16S, que pode ser avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante

(DGGE) (MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993) e sequenciamento, para estudos mais detalhados de diversidade (CHELIUS; TRIPLETT, 2001; DERAQSHANI; LUKOW, LIESACK, 2001; LAMBAIS et al., 2005).

Estudos sobre comunidades de *Archaea* em sedimentos de mangue são escassos, e podem contribuir para o melhor entendimento dos processos biogeoquímicos que ocorrem nesse ambiente. Este trabalho tem como objetivo determinar se ocorrem alterações das estruturas das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* ao longo de um perfil de sedimento, bem como caracterizar a comunidade de *Archaea*, através da análise de seqüências do rDNA 16S.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e métodos

4.2.1.1 Área de estudo e amostragem

A área de manguezal está localizada no litoral Sul do Estado de São Paulo, na Ilha do Cardoso, situada no município de Cananéia, encontrando-se inserida no complexo estuarino de Iguape e Cananéia (ilustrações no Anexo). Em Abril de 2003 foram coletadas amostras do perfil de sedimento até 120 cm abaixo do leito de um canal do mangue do rio Ipaneminha (25°04'44''S e 47°56'14''W) com o uso de tubos de policarbonato de 5 cm de diâmetro e 50 cm de comprimento, acoplados a um amostrador para sedimentos marinhos (Cole Parmer Instrument – ilustrações no Anexo). As amostras foram estratificadas a cada 10 cm, sendo que no momento da coleta foram medidos com aparelhos portáteis os valores de pH e Eh em alguns pontos do perfil (Tabela 4.1). As leituras finais de Eh, obtidas com um eletrodo de platina, foram corrigidas pela adição do potencial do eletrodo de referência de calomelano (+244 mV) enquanto as leituras de pH foram obtidas com um eletrodo de vidro calibrado com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0. Os teores de C, H, N e S das camadas de 0-10, 10-20, 20-40, 40-60, 60-80, 80-100 e 100-120 cm foram determinados (Tabela 4.2) em um analisador elementar FISOONS (EA1108 CHNS-O) após secagem da amostra a 60°C até peso constante e maceração em almofariz.

4.2.1.2 Extração do DNA

Para a extração do DNA do solo, utilizou-se o kit FastDNA Spin for Soil (MP Biomedicals) como descrito em detalhes no item 2.2.1.2.

Tabela 4.1 – Valores de pH e Eh em perfil de sedimento do fundo de um canal do manguezal do rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso, SP)

Profundidade (cm)	pH	Eh (mV)
0-10	7,2	-139
10-20	7,2	-174
20-40	7,1	-176
40-60	7,1	-166
60-80	7,0	-143
80-100	7,0	-161

Tabela 4.2 – Teores de C, H, N e S em perfil de sedimento do fundo de um canal do manguezal do rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso, SP)

Profundidade (cm)	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
0-10	5,456	1,305	0,166	1,348
10-20	4,566	1,110	0,109	1,523
20-40	4,931	1,304	0,129	2,077
40-60	3,294	0,901	0,016	1,350
60-80	2,372	0,799	0,011	1,324
80-100	0,910	0,460	0,200	0,556
100-120	0,868	0,450	0,220	0,541

4.2.1.3 PCR-DGGE

As condições de amplificação do rDNA 16S de *Bacteria* e *Archaea* bem como as condições de DGGE e posterior análise estão descritas detalhadamente no item 2.2.1.3.

4.2.1.4 Bibliotecas de rDNA 16S

Para a amplificação inicial do rDNA 16S de *Archaea* do DNA total extraído das camadas 10-20 e 90-100 cm utilizou-se os iniciadores ARCH21f (5' TTC YGG TTG ATC CYG CCI GA 3') e ARCH958r (5' YCC GGC GTT GA(I/C) TCC AAT T 3') (MOYER et al., 1998). Os amplicons resultantes foram utilizados como moldes para uma nova amplificação com os iniciadores ARCH21f (5' TTC YGG TTG ATC CYG CCI GA 3') e ARCH519r (5' TTA CCG CGG CKG CTG 3') (ØVREÅS et al., 1997). Os amplicons obtidos foram clonados e sequenciados como descrito no item 3.2.1.3.

4.2.1.5 Análises das seqüências de rDNA 16S

A forma como as seqüências de rDNA 16S foram processadas e analisadas, bem como os programas utilizados estão descritos item 3.2.1.4.

4.2.2 Resultados

A análise de agrupamento hierárquico dos amplicons de rDNA 16S de *Bacteria* a partir de DGGE mostrou que as comunidades de *Bacteria* nas camadas 0-10 e 10-20 cm são mais similares entre si do que aquelas observadas nas camadas mais profundas (Figura 4.1). Amplicons de *Bacteria* não foram detectados pelo método utilizado neste estudo a partir da profundidade 70-80 cm. A partir dessa profundidade não se observou também DNA nas amostras, após eletroforese em gel de agarose e coloração com syber green (Figura 4.3).

Em contraste, amplicons de *Archaea* foram detectados em amostras das camadas até 100-120 cm de profundidade. Esses dados sugerem que em camadas mais profundas do que 70-80 cm as condições tornam-se limitantes para o crescimento de microrganismos, especialmente bactérias. Da mesma forma as estruturas das comunidades de *Archaea* a partir da mesma

profundidade apresentou alterações suficientes para diferenciá-las das comunidades das camadas superiores (Figura 4.2).

Correlações destas variações com alterações de pH e Eh não foram observadas, já que esses atributos mostraram-se relativamente constantes ao longo do perfil (Tabela 4.1). No entanto, reduções dos teores de C, H e S foram observadas nas camadas de 80-100 cm e 100-120 cm, quando comparado com as camadas superiores (Tabela 4.2). Os teores de C nas camadas 60-80 cm e 80-100 cm foram 56,6% e 83,3% menores em relação à camada 0-10 cm. Essa redução no teor de C pode afetar o metabolismo microbiano e exercer papel fundamental na determinação da estrutura das comunidades microbianas.

Também se podem observar reduções de 60% a 75% nos teores de S das camadas de 80-100 cm e 100-120 cm quando comparados com as camadas superiores (Tabela 4.2). Esta redução também pode ser importante para a determinação da estrutura das comunidades microbianas, considerando a importância deste elemento nos ciclos biogeoquímicos destes sedimentos.

A Tabela 4.3 mostra a afiliação filogenética das seqüências de rDNA 16S de *Archaea* das camadas 10-20 cm (MGCU) e 90-100 cm (MGCL), determinadas utilizando-se o RDP Classifier (Confidence threshold – 95%), e a seqüência mais similar encontrada no banco de dados do NCBI. Pode-se observar que as seqüências analisadas possuem relação com seqüências obtidas de ambientes marinhos, estuarinos e sedimentares, possuindo alta similaridade com as mesmas (Tabela 4.3). Grande parte das seqüências foi classificada apenas no nível de domínio. Na camada mais superficial (MGCU) aproximadamente 75% das seqüências classificadas como *Archaea* foram classificadas também no filo *Euryarchaeota* (Figuras 4.3a e 4.3b). Duas seqüências foram classificadas na classe *Thermoprotei* (MGCL067A e MGCU102A), uma na ordem *Methanosarcinales* (MGCU057A), duas na família *Methanomicrobiaceae* (MGCU132A e MGCU105A), uma no gênero *Methanosarcina* (MGCU076A) e uma no gênero *Methanolobus* (MGCU054A) (Tabela 4.3). Apenas duas seqüências (MGCL039A e MGCL060), detectadas na camada mais profunda, foram classificadas como pertencentes ao filo *Crenarchaeota*. Aproximadamente 15% das seqüências não foram classificadas com o RDP Classifier, apesar de apresentarem similaridade com seqüências encontradas em ambientes correlatos (Tabela 4.3). A Figura 4.3a mostra que a frequência de seqüências não classificadas é maior na camada mais profunda (MGCL). A Figura 4.3b mostra que a frequência de seqüências classificadas no filo *Euryarchaeota* é 4,4 vezes maior na camada mais superficial (MGCU) do que na mais

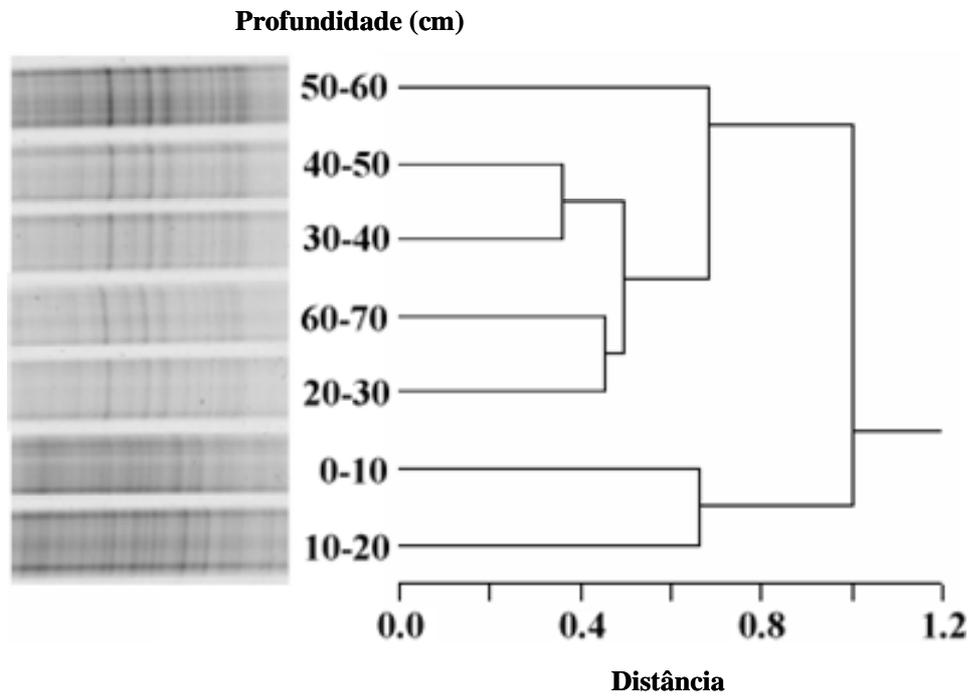


Figura 4.1 – Agrupamento hierárquico com base na separação de amplicons de rDNA 16S de *Bacteria* por DGGE em subamostras (cm) de perfil do fundo de canal de mangue do rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso, SP)

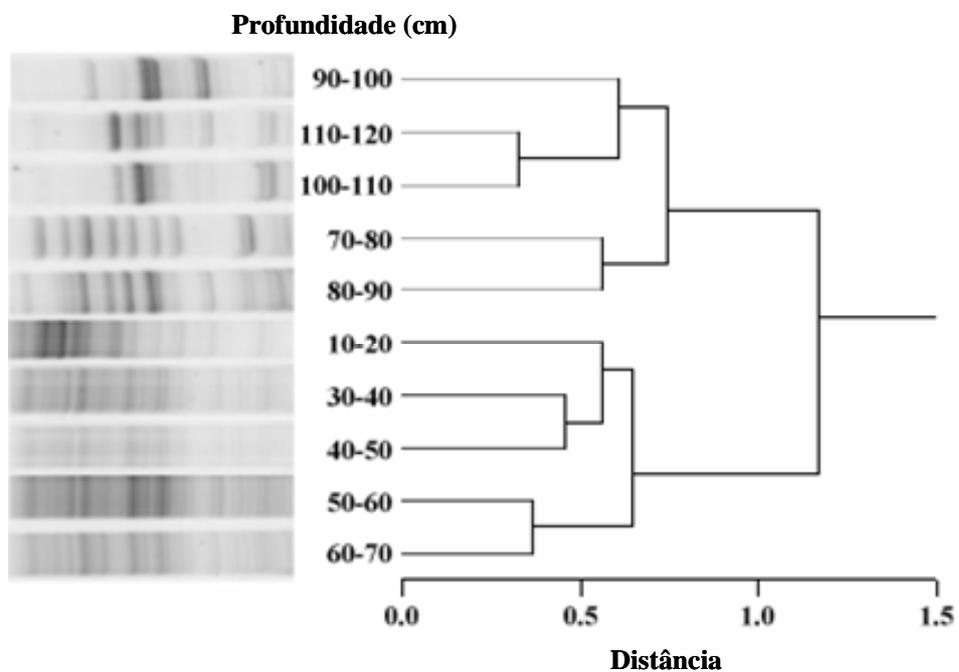


Figura 4.2 – Agrupamento hierárquico com base na separação de amplicons de rDNA 16S de *Archaea* por DGGE em subamostras (cm) de perfil do fundo de canal de mangue do rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso, SP)

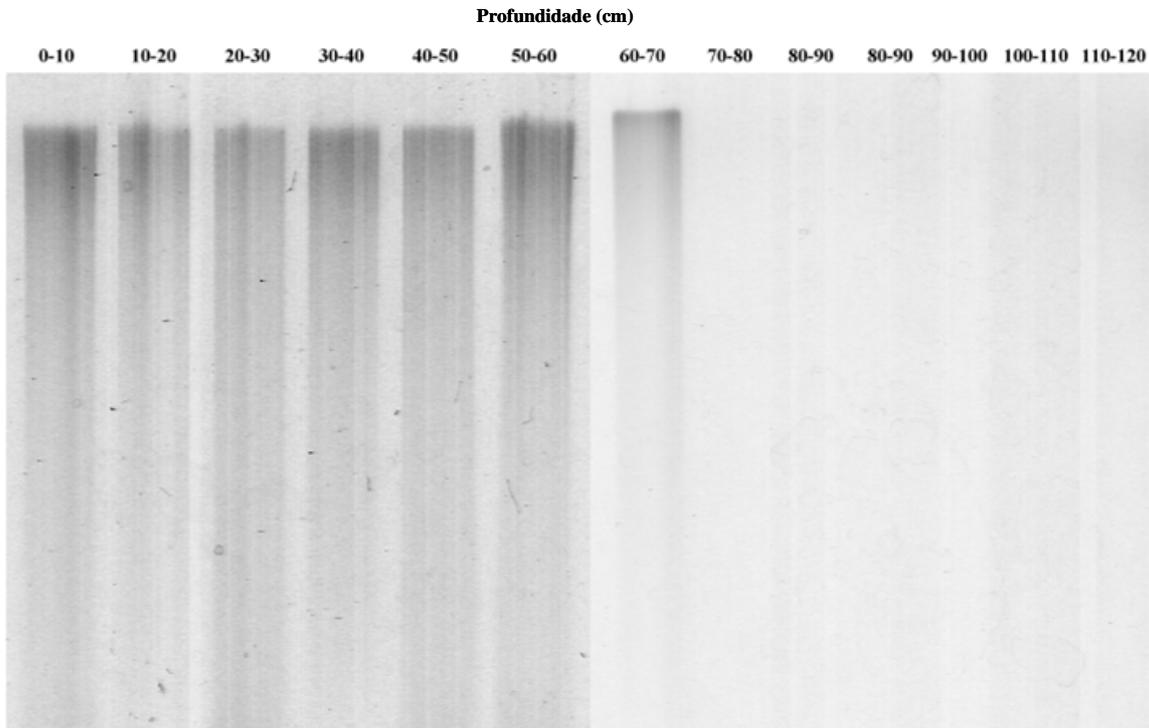


Figura 4.3 – DNA metagenômico extraído de amostras de sedimento de fundo de canal de mangue do Rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso – SP)

profunda (MGCL). Na camada mais profunda, a frequência de seqüências não classificadas em filós foi 3,2 vezes maior do que na camada mais superficial. Se o limite de confiança de 95% for desconsiderado, a quantidade de seqüências classificadas no filo *Crenarchaeota* aumenta consideravelmente, principalmente na camada mais profunda (MGCL – Figura 4.4). Na figura 4.4 pode-se observar também que a maior frequência de seqüências classificadas no filo *Euryarchaeota* foram detectadas na subamostra mais superficial (MGCU) e que a maioria das seqüências não classificadas no domínio *Archaea* foram detectadas na camada mais profunda (MGCL – Figura 4.4).

As estimativas de riqueza de de UTOs (Tabela 4.4) indicam que a diversidade de *Archaea* nas duas profundidades não diferiram estatisticamente, muito embora tenha sido observada uma tendência de maior riqueza de UTOs na camada mais profunda. Já os índices de Shannon indicam não haver diferença significativa, considerando os altos valores do intervalo de confiança (Tabela 4.4). A tabela 4.4 também mostra que, para a distância evolutiva de 0,01, a cobertura de amostragem foi de aproximadamente 48% e 36% das UTOs presentes em MGCU e MGCL,

respectivamente. As estimativas de número de filotipos de *Archaea* em função da distância evolutiva mostra que a partir de uma distância evolutiva de 0,05 riqueza de filotipos na camada mais profunda (MGCL) é significativamente maior, sugerindo que as estruturas das comunidades são distintas (Figura 4.5).

A análise das comunidades de *Archaea* utilizando-se o S-LIBSHUFF mostrou que as mesmas significativamente diferentes nas camadas 10-20 cm (MGCU) e 90-100 cm (MGCL), já que os valores de p calculados foram de 0,0000 para a comparação das curvas de cobertura homólogas de MGCU e MGCL (valores de p mínimos de 0,005 e 0,025, para 1% e 5% de probabilidade, respectivamente).

4.2.3 Discussão

Dos quatro filos de *Archaea* já caracterizados (*Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota* e *Nanoarchaeota*), apenas dois, *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota* foram detectados no sedimento do canal de mangue.

Árqueas do filo *Crenarchaeota* estão presentes tanto em ambientes de temperaturas extremas, de onde foram obtidos os primeiros isolados (BUCKLEY; GRABER; SCHMIDT, 1998), quanto em ambiente marinho, (DeLONG, 1992; FUHRMAN; McCALLUM; DAVIS, 1992, 1993; DeLONG et al., 1994; MASSANA et al., 1997), solos (UEDA; SUGA; MATSUGUCHI, 1995; BINTRIM et al., 1997;), sedimento de água doce (HERSHBERGER et al., 1996; MacGREGOR et al., 1997; SCHLEPER; HOLBEN; KLENK, 1997) e sedimento estuarino (KIM et al., 2005). O filo *Euryarchaeota*, também ubíquo na natureza, é um grupo bastante diversificado filogeneticamente e inclui microrganismos halofílicos, termofílicos e metanogênicos, dentre outros (PESARO; WIDMER, 2002).

Ao contrário de bactérias, não se sabe ao certo quais as funções da maioria das árqueas nos ambientes onde são encontradas. O grupo melhor caracterizado é o dos metanogênicos, classificados no filo *Euryarchaeota*. A produção de metano (CH_4) ocorre quando a degradação da matéria orgânica é feita em condições anóxicas e ocorre mais intensamente quando não há aceptores de elétrons preferenciais como NO_3^- , Fe^{3+} e SO_4^{2-} (ACHTNICH et al., 1995; JAKOBSEN et al., 1981). Os aceptores finais passam a ser moléculas orgânicas de baixa massa

Tabela 4.3 – Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de rDNA 16S de *Archaea* encontradas em sedimento do fundo de um canal do manguezal do rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso, SP) nas profundidades 10-20 cm (MGCU) e 90-100 cm (MGCL)

(Continua)

Seqüência	Classificação* ¹	ID (%)* ²	e-value* ³	Acesso* ⁴	Autor* ⁵	Organismo / Ambiente
MGCU007A	ND* ⁶	88,2	5E-120	AB109881.1	NUNOURA et al., 2005 (np)* ⁷	<i>Archaea</i> – sedimento
MGCU051A	<i>Euryarchaeota</i>	96,4	0	AB177232.1	INAGAKI et al., 2006	procariotos – sedimento oceânico
MGCL116A	<i>Archaea</i>	98,3	2,00E-169	AB177263.1	* ⁸	
MGCL007A	<i>Archaea</i>	94,6	2,00E-174			
MGCL034A	ND	90,5	2,00E-133			
MGCL037A	<i>Archaea</i>	96,8	0			
MGCL038A	<i>Archaea</i>	97,6	0	AB177272.1		
MGCL075A	<i>Archaea</i>	97,2	0			
MGCL094A	<i>Archaea</i>	98,0	0			
MGCL098A	<i>Archaea</i>	97,8	0			
MGCL014A	ND	93,5	6,00E-164	AB177274.1		
MGCL073A	<i>Archaea</i>	93,1	1,00E-151	AB237742.1	SHIMIZU et al., 2005 (np)	procariotos – água subsuperficial
MGCL077A	<i>Archaea</i>	95,4	5,00E-175			
MGCL114A	<i>Archaea</i>	97,7	0			
MGCU092A	<i>Archaea</i>	86,6	6E-144	AF005765.2	CHANDLER et al., 1998	procariotos – solo subsuperficial
MGCU118A	<i>Euryarchaeota</i>	96,6	0	AF015971.2	MUNSON, 1997 (np)	<i>Archaea</i> – salt marsh
MGCU120A	<i>Euryarchaeota</i>	97,0	0			
MGCU139A	<i>Euryarchaeota</i>	95,5	0			
MGCU130A	<i>Euryarchaeota</i>	96,0	0	AF142981.1	BOWMAN et al., 2000	procariotos – sedimento anóxico antártico
MGCU147A	ND	76,9	5E-36			
MGCU132A	<i>Methanomicrobiaceae</i>	97,5	0	AF220337.1	ORPHAN et al, 2000	procariotos – reservatórios de petróleo
MGCU105A	<i>Methanomicrobiaceae</i>	93,8	0	AF220338.1		
MGCL013A	ND	91,9	3,00E-97	AJ131274.1	JURGENS et al., 2000	<i>Archaea</i> – lago de floresta
MGCU012A	<i>Euryarchaeota</i>	95,5	0	AJ294857.1	BREHMER, 2000 (np)	<i>Archaea</i> – sedimento oceânico
MGCU106A		97,6	0			
MGCL003A	<i>Archaea</i>	95,8	0			
MGCL012A	<i>Archaea</i>	95,5	1,00E-180			
MGCL016A	<i>Archaea</i>	95,5	1,00E-180			
MGCL018A	<i>Archaea</i>	95,8	0			
MGCL024A	ND	89,1	6,00E-55			

Tabela 4.3 – Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de rDNA 16S de *Archaea* encontradas em sedimento do fundo de um canal do manguezal do rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso, SP) nas profundidades 10-20 cm (MGCU) e 90-100 cm (MGCL)

(Continuação)

Seqüência	Classificação* ¹	ID (%)* ²	e-value* ³	Acesso* ⁴	Autor* ⁵	Organismo / Ambiente
MGCL028A	<i>Archaea</i>	94,2	0	AJ294865.1		
MGCL031A	<i>Archaea</i>	96,2	0			
MGCL033A	ND	88,4	2,00E-128			
MGCL065A	<i>Archaea</i>	93,3	2,00E-159			
MGCL108A	<i>Archaea</i>	90,6	5,00E-135			
MGCU116A	<i>Euryarchaeota</i>	98,4	1E-150	AJ556515.1	WU; FRIEDRICH; CONRAD, 2006	metanogênicos – solos temperados anoxicos
MGCU082A	<i>Archaea</i>	95,8	0	AJ578146.1	KNITTEL et al., 2005	metanotróficos - marinho
MGCL004A	<i>Archaea</i>	93,6	3,00E-167	AJ579323.1		
MGCL008A	ND	91,0	5,00E-105			
MGCL009A	ND	90,5	5,00E-120			
MGCL010A	ND	88,4	4,00E-96			
MGCL011A	ND	90,9	5,00E-110			
MGCL017A	<i>Archaea</i>	92,0	5,00E-155			
MGCL019A	ND	91,5	2,00E-138			
MGCL020A	ND	90,3	5,00E-120			
MGCL032A	<i>Archaea</i>	95,2	0			
MGCL036A	<i>Archaea</i>	95,0	1,00E-175			
MGCL046A	<i>Archaea</i>	95,2	0			
MGCL112A	<i>Archaea</i>	94,8	0			
MGCL002A	ND	94,4	3,00E-62	AJ579325.1		
MGCL026A	ND	91,6	3,00E-52			
MGCU023A	<i>Euryarchaeota</i>	99,4	0	AJ579728.1	SHAO et al., 2004	Archaea – sedimento de piscicultura
MGCU069A	<i>Euryarchaeota</i>	99,5	0			
MGCU088A	<i>Euryarchaeota</i>	99,6	0			
MGCU100A	<i>Euryarchaeota</i>	99,8	0			
MGCU111A	<i>Euryarchaeota</i>	99,6	0			
MGCU133A	<i>Euryarchaeota</i>	98,7	0			
MGCU140A	<i>Euryarchaeota</i>	99,8	0			
MGCU110A	<i>Euryarchaeota</i>	99,4	0			
MGCU003A	<i>Euryarchaeota</i>	98,3	0			

Tabela 4.3 – Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de rDNA 16S de *Archaea* encontradas em sedimento do fundo de um canal do manguezal do rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso, SP) nas profundidades 10-20 cm (MGCU) e 90-100 cm (MGCL)

(Continuação)

Seqüência	Classificação* ¹	ID (%)* ²	e-value* ³	Acesso* ⁴	Autor* ⁵	Organismo / Ambiente
MGCU013A	<i>Euryarchaeota</i>	98,0	0			
MGCU024A	<i>Euryarchaeota</i>	98,1	0			
MGCU025A	<i>Euryarchaeota</i>	97,9	0			
MGCU036A	<i>Euryarchaeota</i>	98,3	0			
MGCU037A	<i>Euryarchaeota</i>	98,3	0			
MGCU066A	<i>Euryarchaeota</i>	98,5	0			
MGCU068A	<i>Euryarchaeota</i>	98,5	0	AJ579729.1		
MGCU074A	<i>Euryarchaeota</i>	96,6	0			
MGCU090A	<i>Euryarchaeota</i>	98,1	0			
MGCU095A	<i>Euryarchaeota</i>	98,7	0			
MGCU104A	<i>Euryarchaeota</i>	98,0	0			
MGCU113A	<i>Euryarchaeota</i>	99,1	0			
MGCU115A	<i>Euryarchaeota</i>	97,9	0			
MGCU142A	<i>Euryarchaeota</i>	98,0	0			
MGCU143A	<i>Euryarchaeota</i>	98,0	0			
MGCU137A	<i>Euryarchaeota</i>	98,3	0	AJ579730.1		
MGCU076A	<i>Methanosarcina</i>	99,2	0	AJ579734.1		
MGCU038A	<i>Euryarchaeota</i>	98,5	0			
MGCU042A	<i>Euryarchaeota</i>	99,3	0			
MGCU049A	<i>Euryarchaeota</i>	99,3	0			
MGCU050A	<i>Euryarchaeota</i>	99,0	0			
MGCU060A	<i>Euryarchaeota</i>	98,5	5E-165			
MGCU061A	<i>Euryarchaeota</i>	99,3	0	AJ579735.1		
MGCU073A	<i>Euryarchaeota</i>	98,8	0			
MGCU096A	<i>Euryarchaeota</i>	99,3	0			
MGCU107A	<i>Euryarchaeota</i>	99,0	0			
MGCU144A	<i>Euryarchaeota</i>	94,8	5E-175			
MGCU154A	<i>Euryarchaeota</i>	99,5	0			
MGCU006A	<i>Euryarchaeota</i>	97,0	0	AJ579743.1		
MGCU079A	<i>Euryarchaeota</i>	87,6	1E-125			

Tabela 4.3 – Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de rDNA 16S de *Archaea* encontradas em sedimento do fundo de um canal do manguezal do rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso, SP) nas profundidades 10-20 cm (MGCU) e 90-100 cm (MGCL)

(Continuação)

Seqüência	Classificação* ¹	ID (%)* ²	e-value* ³	Acesso* ⁴	Autor* ⁵	Organismo / Ambiente
MGCU028A	<i>Archaea</i>	94,3	3E-172	AJ579748.1		
MGCU094A	<i>Archaea</i>	96,4	0			
MGCU045A	<i>Archaea</i>	98,8	0	AJ579755.1		
MGCU124A	ND	95,9	0	AJ579756.1		
MGCU075A	ND	96,9	0	AJ579760.1		
MGCL072A	ND	94,6	7,00E-39	AJ583424.1	SELENSKA-POBELL, 2003 (np)	procariotos – mina de Urânio
MGCL047A	ND	92,6	8,00E-29	AJ867799.1	PARKES et al., 2005	procariotos – sedimento oceânico
MGCL106A	<i>Archaea</i>	94,9	2,00E-79			
MGCL039A	<i>Crenarchaeota</i>	96,8	5,00E-130			
MGCL043A	<i>Archaea</i>	92,8	1,00E-130	AJ867801.1		
MGCL058A	ND	89,5	9,00E-63			
MGCU122A	<i>Archaea</i>	97,0	0	AJ969762.1	WALSH; PAPKE; DOOLITTLE, 2005	<i>Archaea</i> – solo salino
MGCU123A	<i>Archaea</i>	97,2	0	AJ969795.1		
MGCL068A	<i>Archaea</i>	93,4	1,00E-101	AY093450.1	REED et al., 2002	procariotos – sedimento oceânico
MGCL091A	<i>Archaea</i>	99,5	0			
MGCL049A	<i>Archaea</i>	94,5	3,00E-172			
MGCL050A	<i>Archaea</i>	95,2	8,00E-178			
MGCL053A	<i>Archaea</i>	95,5	1,00E-180			
MGCL062A	<i>Archaea</i>	95,0	3,00E-177			
MGCL067A	<i>Thermoprotei</i>	95,3	6,00E-179			
MGCL071A	<i>Archaea</i>	93,1	2,00E-154	AY093451.1		
MGCL083A	<i>Archaea</i>	95,3	6,00E-179			
MGCL090A	<i>Archaea</i>	94,1	3,00E-157			
MGCL097A	<i>Archaea</i>	93,9	2,00E-149			
MGCL122A	<i>Archaea</i>	95,3	2,00E-178			
MGCL078A	ND	92,1	2,00E-94	AY093454.1		
MGCL119A	<i>Archaea</i>	93,3	1,00E-120			
MGCU009A	ND	95,8	0	AY166033.1	SCHRENK et al., 2003	procariotos – fonte hidrotermal oceânica
MGCU098A	ND	95,1	2E-178			
MGCL023A	ND	90,0	7,00E-114	AY323217.1	GIRGUIS et al., 2003	metanotróficos - biorreator

Tabela 4.3 – Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de rDNA 16S de *Archaea* encontradas em sedimento do fundo de um canal do manguezal do rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso, SP) nas profundidades 10-20 cm (MGCU) e 90-100 cm (MGCL)

(Continuação)

Seqüência	Classificação* ¹	ID (%)* ²	e-value* ³	Acesso* ⁴	Autor* ⁵	Organismo / Ambiente
MGCU019A	<i>Euryarchaeota</i>	96,00	0			
MGCU027A	<i>Euryarchaeota</i>	97,4	0			
MGCU056A	<i>Euryarchaeota</i>	98,0	0			
MGCU065A	<i>Euryarchaeota</i>	98,0	0			
MGCU077A	<i>Euryarchaeota</i>	97,9	0	AY323220.1		
MGCU085A	<i>Euryarchaeota</i>	95,3	0			
MGCU086A	<i>Euryarchaeota</i>	98,1	0			
MGCU114A	<i>Euryarchaeota</i>	97,6	0			
MGCU129A	<i>Euryarchaeota</i>	98,5	0			
MGCU135A	<i>Euryarchaeota</i>	98,5	0			
MGCU136A	<i>Euryarchaeota</i>	96,7	0	AY341270.1	ELSHAHED et al., 2004	<i>Archaea</i> – fontes hidrotermais
MGCU152A	<i>Euryarchaeota</i>	97,7	0			
MGCU155A	<i>Euryarchaeota</i>	97,7	0			
MGCU151A	<i>Euryarchaeota</i>	85,6	3E-112	AY341286.1		
MGCU070A	<i>Euryarchaeota</i>	97,4	0	AY396628.1	KIM et al., 2005	<i>Archaea</i> – sedimento estuarino
MGCU052A	<i>Euryarchaeota</i>	94,8	1E-175	AY396630.1		
MGCU126A	<i>Euryarchaeota</i>	99,5	0			
MGCU020A	<i>Euryarchaeota</i>	98,2	0	AY396635.1		
MGCU109A	<i>Archaea</i>	98,1	0	AY396704.1		
MGCL056A	<i>Archaea</i>	93,0	6,00E-164	AY591991.1	HEIJS; Van der WIELEN; FORNEY, 2004 (np)	procariotos – sedimento vulcânico
MGCL055A	<i>Archaea</i>	92,0	4,00E-151			
MGCL095A	ND	92,4	3,00E-62	AY592480.1		
MGCL104A	ND	96,2	5,00E-105			
MGCL123A	ND	92,4	1,00E-66			
MGCU039A	<i>Euryarchaeota</i>	97,7	0	AY781367.1	HONG; GUO, 2004 (np)	procariotos - sedimento
MGCU055A	<i>Euryarchaeota</i>	97,0	0			
MGCU148A	<i>Euryarchaeota</i>	97,08	0			
MGCU017A	ND	79,4	1E-37	AY781369.1		
MGCU057A	<i>Methanosarcinales</i>	97,8	0	AY970347.1	MA; LIU; DONG, 2006	<i>Methanosaeta harundinace</i> - metanogênico-bioreator
MGCL089A	ND	83,6	5,00E-95	CP000086.1	KIM et al., 2005	<i>Bacteria</i> - patogênica em planta (?)

Tabela 4.3 – Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de rDNA 16S de *Archaea* encontradas em sedimento do fundo de um canal do manguezal do rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso, SP) nas profundidades 10-20 cm (MGCU) e 90-100 cm (MGCL)

(Continuação)

Seqüência	Classificação* ¹	ID (%)* ²	e-value* ³	Acesso* ⁴	Autor* ⁵	Organismo / Ambiente
MGCL092A	ND	78,0	0	CP000267.1	COPELAND et al., 2006 (nd)	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i> – genoma (?)
MGCU015A	<i>Euryarchaeota</i>	94,0	0	DQ103669.1	SORENSEN et al., 2005	procariotos – fonte hipersalina
MGCU125A	<i>Euryarchaeota</i>	95,6	0			
MGCU014A	<i>Euryarchaeota</i>	98,5	0	DQ129982.1	JIANG et al., 2006	procariotos – lago hipersalino
MGCU128A	<i>Archaea</i>	87,9	8E-148	DQ190088.1	STRAP; COLWELL; CRAWFORD, 2005 (np)	procariotos - aquífero
MGCU149A	ND	87,9	8E-148			
MGCL035A	ND	90,0	2,00E-109	DQ301913.1	CADILLO-QUIROZ et al., 2006	metanogênicos – perfil de solo
MGCL029A	ND	80,0	3,00E-67	DQ301964.1	LEVER et al., 2005 (np)	<i>Archaea</i> – sedimento oceânico
MGCL061A	<i>Archaea</i>	88,4	1,00E-111			
MGCU029A	ND	88,8	1,00E-135			
MGCU046A	ND	90,8	2,00E-168	DQ301971.1		
MGCU081A	ND	90,8	2,00E-168			
MGCL044A	<i>Archaea</i>	96,5	0	DQ301982.1		
MGCL102A	<i>Archaea</i>	95,2	2,00E-178			
MGCL045A	<i>Archaea</i>	97,8	0			
MGCL069A	<i>Archaea</i>	97,8	0			
MGCL070A	<i>Archaea</i>	94,6	1,00E-170			
MGCL081A	<i>Archaea</i>	97,5	0	DQ301984.1		
MGCL086A	<i>Archaea</i>	96,5	0			
MGCL087A	<i>Archaea</i>	93,3	5,00E-160			
MGCL096A	<i>Archaea</i>	93,7	3,00E-152			
MGCL121A	<i>Archaea</i>	97,5	0			
MGCL059A	<i>Archaea</i>	95,8	0			
MGCL060A	<i>Crenarchaeota</i>	95,8	0			
MGCL064A	ND	90,8	2,00E-148	DQ301994.1		
MGCL066A	<i>Archaea</i>	96,3	0			
MGCL084A	<i>Archaea</i>	96,0	0			
MGCL101A	<i>Archaea</i>	96,5	0			
MGCU033A	ND	95,0	1E-176	DQ302020.1	BIDDLE et al., 2006	<i>Archaea</i> – sedimento subsuperficial
MGCL021A	<i>Archaea</i>	96,3	0	DQ363752.1	YAN; HONG, 2006 (np)	<i>Archaea</i> – solo de mangue

Tabela 4.3 – Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da sequência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de rDNA 16S de *Archaea* encontradas em sedimento do fundo de um canal do manguezal do rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso, SP) nas profundidades 10-20 cm (MGCU) e 90-100 cm (MGCL)

(Continuação)

Seqüência	Classificação* ¹	ID (%)* ²	e-value* ³	Acesso* ⁴	Autor* ⁵	Organismo / Ambiente
MGCL040A	ND	94,4	4,00E-136			
MGCL057A	<i>Archaea</i>	98,3	0			
MGCL063A	<i>Archaea</i>	96,9	1,00E-151			
MGCL079A	<i>Archaea</i>	96,0	0			
MGCL082A	<i>Archaea</i>	95,5	0			
MGCL093A	<i>Archaea</i>	99,0	0			
MGCU001A	<i>Archaea</i>	96,3	0	DQ363774.1		
MGCU021A	<i>Archaea</i>	99,6	0	DQ363790.1		
MGCU031A	<i>Archaea</i>	98,6	0	DQ363796.1		
MGCU002A	<i>Archaea</i>	97,2	0			
MGCU030A	<i>Archaea</i>	97,5	0	DQ363799.1		
MGCU141A	<i>Archaea</i>	96,2	0			
MGCU078A	<i>Archaea</i>	95,2	0	DQ363800.1		
MGCU004A	<i>Archaea</i>	98,8	0			
MGCU005A	<i>Archaea</i>	98,8	0			
MGCU011A	<i>Archaea</i>	99,5	0			
MGCU018A	<i>Archaea</i>	97,7	0			
MGCU062A	<i>Archaea</i>	98,5	0	DQ363802.1		
MGCU080A	<i>Archaea</i>	98,4	0			
MGCU087A	<i>Archaea</i>	99,2	0			
MGCU089A	<i>Archaea</i>	99,5	0			
MGCU112A	<i>Archaea</i>	99,3	0			
MGCU138A	<i>Archaea</i>	93,1	2E-163			
MGCU102A	<i>Thermoprotei</i>	99,3	0	DQ363806.1		
MGCU093A	<i>Archaea</i>	97,0	0	DQ363809.1		
MGCU040A	<i>Archaea</i>	94,3	1E-171	DQ363821.1		
MGCU032A	<i>Archaea</i>	99,0	0			
MGCU097A	<i>Archaea</i>	98,0	0	DQ363828.1		
MGCU103A	<i>Archaea</i>	99,0	0			
MGCU035A	<i>Euryarchaeota</i>	97,2	0	DQ363831.1		

Tabela 4.3 – Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de rDNA 16S de *Archaea* encontradas em sedimento do fundo de um canal do manguezal do rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso, SP) nas profundidades 10-20 cm (MGCU) e 90-100 cm (MGCL)

(Continuação)

Seqüência	Classificação* ¹	ID (%)* ²	e-value* ³	Acesso* ⁴	Autor* ⁵	Organismo / Ambiente
MGCU059A	<i>Euryarchaeota</i>	99,3	0			
MGCU026A	<i>Euryarchaeota</i>	95,9	0	DQ363833.1		
MGCU048A		96,6	0			
MGCL001A	<i>Euryarchaeota</i>	93,2	5,00E-130			
MGCL005A	<i>Euryarchaeota</i>	96,8	0			
MGCL022A	<i>Euryarchaeota</i>	92,1	3,00E-152			
MGCL025A	<i>Euryarchaeota</i>	96,3	0			
MGCL052A	<i>Euryarchaeota</i>	97,0	0			
MGCL054A	ND	93,6	9,00E-113			
MGCL074A	ND	97,9	3,00E-87			
MGCL076A	<i>Euryarchaeota</i>	97,0	0			
MGCL080A	<i>Euryarchaeota</i>	95,5	0			
MGCL088A	<i>Euryarchaeota</i>	95,5	0	DQ363834.1		
MGCL099A	<i>Euryarchaeota</i>	94,1	5,00E-150			
MGCL109A	<i>Euryarchaeota</i>	95,5	5,00E-170			
MGCL110A	<i>Euryarchaeota</i>	93,8	2,00E-168			
MGCL113A	<i>Euryarchaeota</i>	96,8	0			
MGCL115A	<i>Euryarchaeota</i>	97,0	0			
MGCL117A	ND	94,9	2,00E-69			
MGCL118A	<i>Archaea</i>	98,4	7,00E-124			
MGCL120A	<i>Euryarchaeota</i>	96,6	0			
MGCU010A	<i>Euryarchaeota</i>	96,8	0			
MGCU016A	<i>Euryarchaeota</i>	97,0	0			
MGCU022A	<i>Euryarchaeota</i>	98,3	0			
MGCU043A	<i>Euryarchaeota</i>	98,5	0			
MGCU064A	<i>Euryarchaeota</i>	95,5	5E-180			
MGCU072A	<i>Euryarchaeota</i>	97,0	0	DQ363835.1		
MGCU099A	<i>Euryarchaeota</i>	98,5	0			
MGCU119A	<i>Euryarchaeota</i>	98,3	0			
MGCU121A	<i>Euryarchaeota</i>	97,0	0			

Tabela 4.3 – Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de rDNA 16S de *Archaea* encontradas em sedimento do fundo de um canal do manguezal do rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso, SP) nas profundidades 10-20 cm (MGCU) e 90-100 cm (MGCL)

(Continuação)

Seqüência	Classificação* ¹	ID (%)* ²	e-value* ³	Acesso* ⁴	Autor* ⁵	Organismo / Ambiente
MGCU131A	<i>Euryarchaeota</i>	98,0	0			
MGCU145A	<i>Euryarchaeota</i>	97,5	0			
MGCU041A	<i>Euryarchaeota</i>	96,8	0	DQ363836.1		
MGCU053A	<i>Euryarchaeota</i>	97,2	0			
MGCU058A	<i>Euryarchaeota</i>	99,5	0			
MGCU108A	<i>Euryarchaeota</i>	95,2	5E-175	DQ363837.1		
MGCU117A	<i>Euryarchaeota</i>	98,9	0			
MGCU146A	<i>Euryarchaeota</i>	98,5	0			
MGCU008A	<i>Euryarchaeota</i>	98,7	0			
MGCU034A	<i>Euryarchaeota</i>	98,3	0			
MGCU047A	<i>Euryarchaeota</i>	98,5	0			
MGCU063A	<i>Euryarchaeota</i>	98,7	0			
MGCU071A	<i>Euryarchaeota</i>	98,8	0	DQ363838.1		
MGCU083A	<i>Euryarchaeota</i>	98,3	0			
MGCU084A	<i>Euryarchaeota</i>	98,7	0			
MGCU101A	<i>Euryarchaeota</i>	98,1	0			
MGCU134A	<i>Euryarchaeota</i>	98,8	0			
MGCU150A	<i>Euryarchaeota</i>	98,8	0			
MGCU153A	<i>Euryarchaeota</i>	97,9	0			
MGCU067A	<i>Euryarchaeota</i>	96,3	0	DQ363844.1		
MGCL006A	ND	91,1	6,00E-25	DQ441512.1	KVIST; AHRING; WESTERMANN, 2006 (np)	<i>Archaea</i> – fonte hidrotermal
MGCL048A	<i>Archaea</i>	96,8	0	DQ469168.1	HU; ZENG; JIAO, 2006 (np)	<i>Archaea</i> - marinho
MGCL107A	<i>Archaea</i>	95,1	2,00E-133			
MGCL111A	<i>Archaea</i>	92,2	2,00E-85			
MGCU054A	<i>Methanobolus</i>	96,2	0	U20155.2	BOONE; WHITMAN; WOESE, 1995 (np)	<i>Methanobolus vulcani</i> -metanogênico-sedimento
MGCU127A	<i>Archaea</i>	87,4	3E-122	U77574.1	SCHLEPER; HOLBEN; KLENK, 1997	<i>Crenarchaeota</i> – sedimento de lago
MGCU044A	ND	Não encontrado	-	-	-	-
MGCU091A	ND					
MGCL015A	ND					
MGCL027A	ND					

Tabela 4.3 – Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de rDNA 16S de *Archaea* encontradas em sedimento do fundo de um canal do manguezal do rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso, SP) nas profundidades 10-20 cm (MGCU) e 90-100 cm (MGCL)

						(Conclusão)
Seqüência	Classificação* ¹	ID (%)* ²	e-value* ³	Acesso* ⁴	Autor* ⁵	Organismo / Ambiente
MGCL030A	ND					
MGCL041A	ND					
MGCL042A	ND					
MGCL051A	ND					
MGCL100A	ND					
MGCL103A	ND					
MGCL105A	ND					
MGCL124A	ND					

*1 – Menor táxon definido com o RDP Classifier do RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) com nível máximo de restrição (Confidence threshold – 95%);
 *2 – Valor de identidade entre as seqüências estudada e a de maior similaridade no banco de dados; *3 – e-value entre as seqüências estudada e a de maior similaridade no banco de dados; *4 – Número de acesso da seqüência de maior similaridade no banco de dados; *5 – Autores do trabalho do qual se originou a seqüência de maior similaridade; *6 – Não determinado; *7 – Trabalho não publicado; *8 – A linha em branco representa a repetição da linha anterior

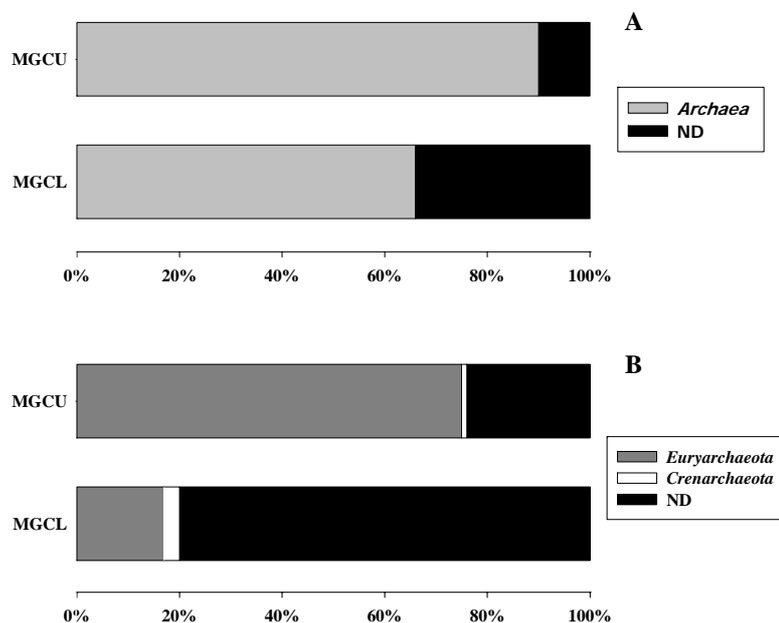


Figura 4.3 – Freqüência relativa de seqüências de rDNA 16S de *Archaea* (A) e de filos (B) nas camadas 10-20 cm (MGCU) e 90-100 cm (MGCL) de sedimento do fundo de canal de mangue. As seqüências foram classificadas com o Classifier do RDP com limite de confiança de 95%

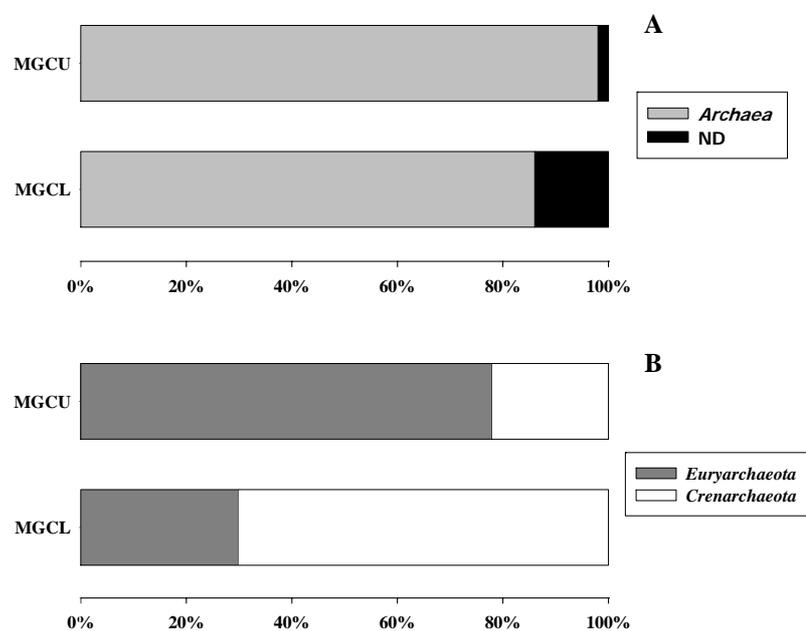


Figura 4.4 – Freqüência relativa de seqüências de rDNA 16S de *Archaea* (A) e de filos (B) nas camadas 10-20 cm (MGCU) e 90-100 cm (MGCL) de sedimento do fundo de canal de mangue. As seqüências foram classificadas com o Classifier do RDP desconsiderando-se valor de limite de confiança.

Tabela 4.4 – Índices de diversidade de *Archaea* e estimativas de número de UTOs e cobertura de amostragem para as subamostras 10-20 cm (MGCU) e 90-100 cm (MGCL) de sedimento de perfil do fundo de canal de mangue

Comunidade	NS	NU	Estumativa de UTOs		Índices de Diversidade		ECA
			ACE	Chao1	Shannon ^a	1/D ^b	
D = 0.01							
MGCU	155	101	387 (256; 631)	347 (225; 591)	4,3 (4,16; 4,45)	44,6 (29,8; 88,5)	0,484
MGCL	124	89	1196 (463; 3365)	1156 (438; 3351)	4,2 (4,04; 4,36)	42,2 (31,8; 62,8)	0,355
D = 0.03							
MGCU	155	73	362 (197; 746)	334 (178; 723)	3,73 (3,55; 3,91)	23,7 (18,3; 33,8)	0,639
MGCL	124	76	637 (287; 1564)	604 (266; 1546)	3,93 (3,75; 4,11)	30,6 (23,7; 43,6)	0,476

^aEstimador de máxima semelhança. ^bRecíproco do índice de Simpson – estimador de máxima semelhança. ^cTodas as seqüências de solo de mangue. ^dTodas as seqüências de solo de marisma. NU, número de UTOs. ECA, estimativa de cobertura de amostragem. Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança

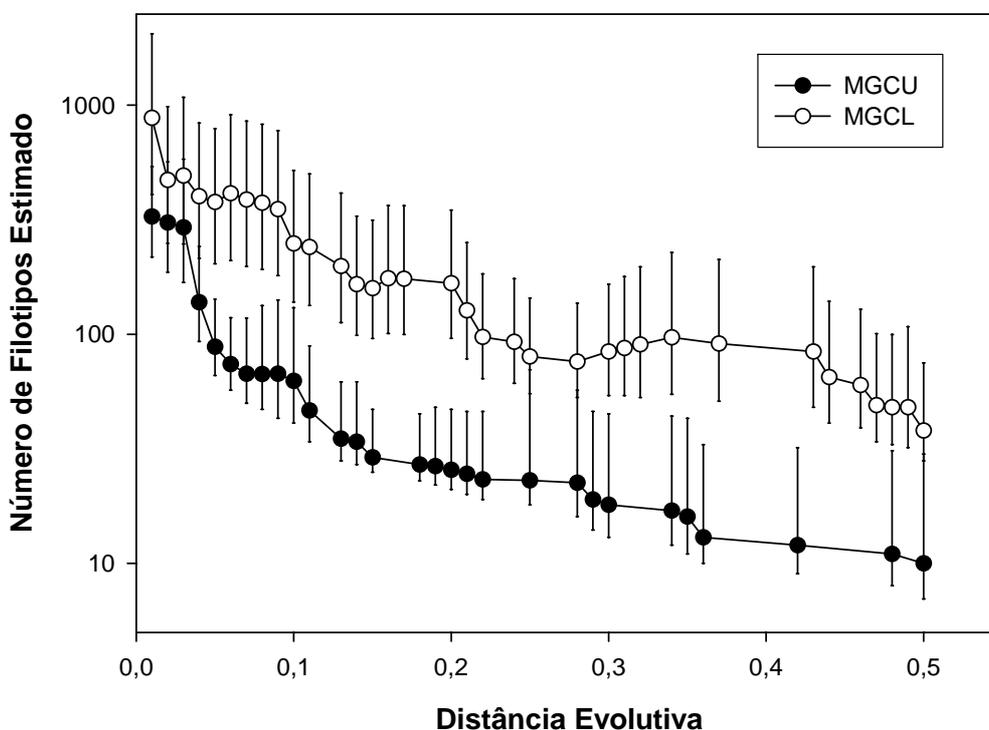


Figura 4.5 – Número de filotipos de *Archaea* estimado para diferentes distâncias evolutivas nas camadas 10-20 cm (MGCU) e 90-100 cm (MGCL) do fundo de canal de mangue utilizando-se o estimador não-paramétrico Chao1. As barras representam o intervalo com 95% de confiança

molecular como acetato (reação 1), provenientes da atividade anaeróbia de muitas espécies de procaríotos, inclusive *Archaea*, e o CO₂ (reação 2).



Apesar de ricos em sulfatos, atividade metanogênica e os microrganismos responsáveis por ela, têm sido detectados em sedimentos marinhos (OREMLAND; MARSH; POLCIN, 1982; SENIOR et al., 1982; MUNSON; NEDWELL; EMBLEY, 1997;). Segundo Munson, Nedwell e Embley (1997), nestes ambientes existe uma competição nos últimos passos da mineralização dos compostos orgânicos de baixa massa molecular por organismos metanogênicos e sulfato redutores, respectivamente, sendo a prevalência de uma via ou outra regulada pela quantidade de

sulfato presente (MARTENS; BERNER, 1974; WINFREY; ZEIKUS, 1977; ABRAM; NEDWELL, 1978; SCHONHEIT; KRISTJANSSON; THAUER, 1982; CAPONE; KIENE, 1988). A manutenção da produção de CH₄ no caso dos ambientes ricos em sulfatos pode ser garantida pela capacidade de espécies de metanogênicas utilizarem substratos alternativos, não utilizados pelas bactérias sulfato-redutoras, como metanol, metilaminas e metionina (OREMLAND; MARSH; POLCIN, 1982; WINFREY; WARD, 1983; KING, 1984;). Como exemplo, pode-se citar a espécie *Methanosarcina acetivorans*, a qual utiliza preferencialmente o acetato, podendo utilizar também metanol e metilaminas como fonte de C (SOWERS; BARON; FERRY, 1984). Essa capacidade metabólica poderia explicar a elevada frequência de seqüências de rDNA 16S classificadas no filo *Euryarchaeota* (Figuras 4.3 e 4.4) e, mais especificamente, em grupos metanogênicos, apesar da presença de aceptores alternativos intermediários como sulfatos e Fe³⁺ neste ambiente (capítulos 2 e 3). Aproximadamente 77% das seqüências de MGCU foram classificadas no filo *Euryarchaeota* (Figura 4.4). Destas, aproximadamente 74% e 26% são de arqueas metanogênicas (classes *Methanomicrobia* e *Methanobacterium*) e não-metanogênicas (classe *Thermoplasmata*), respectivamente. Aproximadamente 27% das seqüências de MGCL foram classificadas no filo *Euryarchaeota* (Figura 4.4). Destas, aproximadamente 33% e 67% são de arqueas metanogênicas (classes *Methanomicrobia* e *Methanobacterium*) e não-metanogênicas (classe *Thermoplasmata*), respectivamente. Estes resultados indicam uma diminuição da frequência de seqüências tanto de *Euryarchaeota* como dos seus representantes metanogênicos com a profundidade. Em um trabalho de análise da variação das comunidades de *Archaea* e, mais especificamente, de metanogênicos em um perfil de solo ácido saturado, Cadillo-Quiroz et al. (2006) encontraram as maiores diferenças na estrutura das comunidades de arqueas a partir de 40 cm de profundidade, onde o pH sofre um pequeno aumento e a quantidade de matéria orgânica facilmente degradável passa a ser menor. Segundo os autores, apesar de não haver grande variação do número de seqüências de rDNA 16S de *Archaea*, as amostras de camadas mais profundas apresentaram grande variação na atividade e estrutura das comunidades de metanogênicos, com expressiva redução da presença de DNA de microrganismos das ordens *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales* (classe *Methanomicrobia*).

As análises de amplicons do rDNA 16S por DGGE e LIBSHUFF mostraram alterações das estruturas das comunidades de *Archaea* quando comparou-se MGCU e MGCL. O aumento

da frequência de seqüências de *Crenarchaeota*, de 23% para 67%, em MGCL indica que a composição da comunidade de *Archaea* pode estar sofrendo alterações já no nível de filo.

Os valores de pH e Eh no perfil de sedimento não apresentaram variações significativas (Tabela 4.1) que pudessem explicar as alterações das estruturas das comunidades de procariotos. No entanto, a diminuição dos teores de C com a profundidade foi elevada (Tabela 4.2), e pode estar associada com as alterações das estruturas das comunidades de árqueas observadas. Estudos mais detalhados das frações orgânicas presentes nas duas condições são necessários para determinar seu efeito na estruturação das comunidades de procariotos.

É possível que a estruturação das comunidades de procariotos nos sedimentos seja determinada por eventos contemporâneos em superfície e por eventos históricos em profundidade, já que o sedimento superficial pode sofrer maiores variações de atributos físico-químicos devido a eventos como ciclos de inundação e adição e transformação de material orgânico quando comparado com sedimento das camadas mais profundas. No entanto, estudos mais detalhados devem ser feitos para testar esta hipótese.

4.3 Conclusões

Microrganismos do domínio *Archaea* foram detectados no sedimento de mangue ao longo de todo o perfil estudado, até 120 cm abaixo do leito de canal, enquanto que *Bacteria* foi detectada até a profundidade de 60-70 cm.

As estruturas das comunidades de *Archaea* variaram significativamente em função da profundidade do sedimento, sem aumento significativo da diversidade, havendo dominância de *Euryarchaeota* nas camadas mais superficiais e de *Crenarchaeota* nas camadas mais profundas.

As variações das estruturas das comunidades de procariotos observadas podem estar relacionadas com alterações de quantidade e composição química da matéria orgânica.

Os sedimentos de mangue possuem grande diversidade de *Archaea*, sendo a grande maioria desta diversidade ainda não caracterizada.

Grande parte das seqüências de rDNA 16S de *Archaea* detectadas nos sedimentos de mangue possuem alta similaridade com seqüências encontradas em sedimentos de outros sistemas estuarinos.

Referências

ABRAM, J.W.; NEDWELL, D.B. Inhibition of methanogenesis by sulfate reducing bacteria competing for transferred hydrogen. **Archives of Microbiology**, New York, v. 117, p. 89-92, 1978.

ACHTNICH, C.; BAK, F.; CONRAD, R. Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers and methanogens in anoxic paddy soil. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v.19, p.65-72, 1995.

BENLLOCH, S.; MARTINEZ-MURCIA, A.J.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Sequencing of bacterial and archaeal 16S rDNA genes directly amplified from a hypersaline environment. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 18, p. 574-581, 1995.

BIDDLE, J.F.; LIPP, J.S.; LEVER, M.A.; LLOYD, K.G.; SORENSEN, K.B.; ANDERSON, R.; FREDRICKS, H.F.; ELVERT, M.; KELLY, T.J.; SCHRAG, D.P.; SOGIN, M.L.; BRENCHLEY, J.E.; TESKE, A.; HOUSE, C.H.; HINRICHS, K.U. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems of Peru. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 3846-3851, 2006.

BINTRIM, S.B.; DONOHUE, T.J.; HANDELSMAN, J.; ROBERTS, G.P.; GOODMAN, R.M. Molecular phylogeny of archaea from soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 277-282, 1997.

BOWMAN, J.P.; REA, S.M.; McCAMMON, S.A.; McMEEKIN, T.A. Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marina basin, Vestfold Hils, Eastern Antarctica, **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 227-237, 2000.

BUCKLEY, D.H.; GRABER, J.R.; SCHMIDT, T.M. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom *Crenarchaeota* and their diversity and abundance in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4333-4339, 1998.

CADILLO-QUIROZ, H.; BRAUER, S.; YASHIRO, E.; SUN, C.; YAVITT, J.; ZINDER, S. Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA. **Environmental Microbiology**, Oxford, (<http://www.blackwell-synergy.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2006.01036.x>), 2006.

CAPONE, D.G.; KIENE, R.P. Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: contrasts in anaerobic carbon catabolism. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 33, p. 725-749, 1988.

CHANDLER, D.P.; BROCKMAN, F.J.; BAILEY, T.J.; FREDRICKSON, J.K. Phylogenetic diversity of Archaea and Bacteria in a deep subsurface paleosol. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p. 37-50, 1998.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of *Archaea* and *Bacteria* in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, p. 252-263, 2001.

DeLONG, E.F. Archaea in coastal marine environments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, p. 5685-5689, 1992.

DeLONG, E.F.; WU, K.Y.; PREZELIN, B.B.; JOVINE, V.M. High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. **Nature**, London, v. 371, p. 695-697, 1994.

DERAKSHANI, M.; LUKOW, T.; LIESACK, W. Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rDNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 623-631, 2001.

ELSHAHED, M.S.; NAJAR, F.Z.; ROE, B.A.; OREN, A.; DEWERS, T.A.; KRUMHOLZ, L.R. Survey of archaeal diversity reveals an abundance of halophilic Archaea in a low-salt, sulfide- and sulfur-rich spring. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 2230-2239, 2004.

FUHRMAN, J.A.; McCALLUM, K.; DAVIS, A.A. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. **Nature**, London, v. 356, p. 148-149, 1992.

FUHRMAN, J.A.; McCALLUM, K.; DAVIS, A.A. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 1294-1302, 1993.

GALAND, P.E.; FRITZE, H.; CONRAD, R.; YRJALA, K. Pathways for methanogenesis and diversity of methanogenic Archaea in three boreal peatland ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 2195-2198, 2005.

GIRGUIS, P.R.; ORPHAN, V.J.; HALLAM, S.J.; DeLONG, E.F. Growth and methane oxidation rates of anaerobic methanotrophic archaea in a continuous-flow bioreactor. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 5472-5482, 2003.

HERSHBERGER, K.L.; BARNS, S.M.; REYSENBACH, A.L.; DAWSON, S.C.; PACE, N.R. Wide diversity of Crenarchaeota. **Nature**, London, v. 384, p. 420, 1996.

INAGAKI, F.; NUNOURA, T.; NAKAGAWA, S.; TESKE, A.; LEVER, M.; LAUER, A.; SUZUKI, M.; TAKAI, K.; DELWICHE, M.; COLWELL, F.S.; NEALSON, K.H.; HORIKOSHI, K.; D'HONDT, S.; JORGENSEN, B.B. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 2815-2820, 2006.

JIANG, H.; DONG, H.; ZHANG, G.; YU, B.; CHAPMAN, L.R.; FIELDS, M.W. Microbial diversity in water and sediment of lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 3832-3845, 2006.

JAKOBSEN, P.; PATRICK, W.H.; WILLIAMS, B.G. Sulfide and methane formation in soils and sediments. **Soil Science**, Philadelphia, v. 132, p.279-287, 1981.

JURGENS, G.; GLOCKNER, F.; AMANN, R.; SAANO, A.; MONTONEN, L.; LIKOLAMMI, M.; MUNSTER, U. Identification of novel Archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 34, p. 445-456, 2000.

KIM, B.S.; OH, H.M.; KANG, H.; CHUN, J. Archaeal diversity in tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 43, p. 144-151, 2005.

KIM, H.S.; SCHELL, M.A.; YU, Y.; ULRICH, R.L.; SARRIA, S.H.; NIERMAN, W.C.; DESHAZER, D. Bacterial genome adaptation to niches: divergence of the potential virulence genes in three burkholderia species of different strategies. **Genomics**, London, v. 6, n. 174 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/6/174>), 2005.

KING, G.M. Utilization of hydrogen, acetate, and “noncompetitive” substrates by methanogenic bacteria in marine sediments. **Geomicrobiological Journal**, Philadelphia, v. 3, p. 275-306, 1984.

KNITTEL, K.; LOSEKANN, T.; BOETIUS, A.; KORT, R.; AMANN, R. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 467-479, 2005.

KOTSYURBENKO, O.R.; CHIN, K.; GLAGOLEV, M.V.; STUBNER, S.; SIMANKOVA, M.V.; NOZHEVNIKOVA, A.N.; CONRAD, R. Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic west-siberian peat bog. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 6, p. 1159-1173, 2004.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos Paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L. R. F.; COOPER, M.; SILVA, A. P.; CARDOSO, E. J.. (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 43-84.

MA, K.; LIU, X.; DONG, X. *Methanosaeta harundinacea* sp. nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 56, p. 127-131, 2006.

MARTINY, J.B.H.; BOHANNAN, B.J.M.; BROWN, J.H.; COLWELL, R.K.; FUHRMAN, J.A.; GREEN, J.L.; HORNER-DEVINE, M.C.; KANE, M.; KRUMINS, J.A.; KUSKE, C.R.; MORIN, P.J.; NAEEM, S.; ØVREÅS, L.; REYSENBACH, A.; SMITH, V.H.; STALEY, T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature**, London, v. 4, p. 102-112, 2006.

MacGREGOR, B.J.; MOSER, D.P.; ALM, E.W.; NEALSON, K.H.; STAHL, D.A. Crenarchaeota in Lake Michigan sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 1178-1181, 1997.

- MARTENS, C.S.; BERNER, R.A. Methane production in the interstitial waters of sulfate-depleted marine sediments. **Science**, Washington, v. 185, p. 1167-1169, 1974.
- MASSANA, R.; MURRAY, A.E.; PRESTON, C.M.; DeLONG, E.F. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara channel. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 50-56, 1997.
- MOYER, C.L.; TIEDJE, J.M.; DOBBS, F.C.; KARL, D.M. Diversity of deep-sea hydrothermal vent *Archaea* from Loihi Seamount, Hawaii. **Deep-sea Research**, Oxford, v. 45, p. 303-317, 1998.
- MUNSON, M.A.; NEDWELL, D.B.; EMBLEY, T.M. Phylogenetic diversity of Archaea in sediment samples from a coastal salt marsh. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4729-4733, 1997.
- MUYZER, G.; WAAL, E.C. de; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rDNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p.695-700, 1993.
- OREMLAND; R.S.; MARSH, L.M.; POLCIN, S. Methane production and simultaneous sulfate reduction in anoxic, salt marsh sediments. **Nature**, London, v. 296, p. 143-145, 1982.
- ORPHAN, V.J.; TAYLOR, L.T.; HAFENBRADL, D.; DeLONG, E.F. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 700-711, 2000.
- ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L. TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1997.
- PARKES, R.J.; WEBSTER, G.; GRAGG, B.A.; WEIGHTMAN, A.J.; NEWBERRY, C.J.; FERDELMAN, T.G.; KALLMEYER, J.; JORGENSEN, B.B.; AIELLO, I.W.; FRY, J.C. Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time. **Nature**, London, v. 436, p. 390-394, 2005.
- PESARO, M.; WIDMER, F. Identification of novel Crenarchaeota and Euryarchaeota clusters associated with different depth layers of a forest soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 42, p. 89-98, 2002.
- POLYMENAKOU, P.N.; BERTILSSON, S.; TSELEPIDES, A.; STEPHANOU, E.G. Bacterial community composition in different sediments from the Eastern Mediterranean Sea: a comparison of four 16S ribosomal DNA clone libraries. **Microbial Ecology**, New York, v. 50, p. 447-462. 2005.

REED, D.W.; FUJITA, Y.; DELWICHE, M.E.; BLACKWELDER, D.B.; SHERIDAN, P.P.; UCHIDA, T.; COLWELL, F.S. Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3759-3770, 2002.

SENIOR, E.; LINDSTROM, E.B.; BANAT, I.; NEDWELL, D.B. Sulfate reduction and methanogenesis in the sediment of a saltmarsh on the east coast of the United Kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, p. 987-996, 1982.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 25, p. 39-67, 2001.

SCHLEPER, C.; HOLBEN, W.; KLENK, H.P. Recovery of crenarchaeotal ribosomal DNA sequences from freshwater-lake sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 321-323, 1997.

SCHONHEIT, P.; KRISTJANSSON, J.K.; THAUER, R.K. Kinetic mechanism for the ability of sulfate reducers to out-compete methanogens for acetate. *Archives of Microbiology*, New York, v. 132, p. 285-288, 1982.

SCHRENK, M.O.; KELLEY, D.S.; DELANEY, J.R.; BAROSS, J.A. Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 3580-3592, 2003.

SHAO, P.; CHEN, Y.Q.; ZHOU, H.; QU, L.H.; JIAO, N.Z.; MA, Y.; LI, Z.Y.; JIAO, N. Phylogenetic diversity of Archaea in aquafarm sediment. **Marine Biology**, New York, v. 146, p. 133-142, 2004.

SORENSEN, K.B.; CANFIELD, D.E.; TESKE, A.P.; OREN, A. Community composition of a hypersaline endoevaporitic microbial mat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 7352-7365, 2005.

SOWERS, K.R.; BARON, S.F.; FERRY, J.G. *Methanosarcina acetivorans* sp. nov., an acetotrophic methane-producing bacterium isolated from marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, p. 971-978, 1984.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, p.240-245, 2002.

UEDA, T.; SUGA, Y.; MATSUGUCHI, T. Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 46, p. 415-421, 1995.

WALSH, D.A.; PAPKE, R.T.; DOOLITTLE, W.F. Archaeal diversity along a soil salinity gradient prone to disturbance. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 1655-1666, 2005.

WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 6578-6583. 1998.

WINFREY, M.R.; WARD, D.M. Substrates for sulfate reduction and methane production in intertidal sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, p. 193-199, 1983.

WU, X.L.; FRIEDRICH, M.W.; CONRAD, R. Diversity and ubiquity of thermophilic methanogenic archaea in temperate anoxic soils. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 394-404, 2006.

5 ESTRUTURA DAS COMUNIDADES DE PROCARIOTOS E DIVERSIDADE DE BACTERIA EM UM PERFIL DE SOLO DE MARISMA

Resumo

Estrutura das comunidades de procariotos e diversidade de *Bacteria* em um perfil de solo de marisma

Microorganismos do domínio *Bacteria* desempenham um papel central em processos biogeoquímicos que ocorrem em solos de ambientes estuarinos como os de marisma. Determinações das estruturas das comunidades e de diversidade de *Bacteria* podem ocorrer em função das diferentes condições físico-químicas dos solos, refletindo na configuração dos processos biogeoquímicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as variações das estruturas das comunidades de procariotos e diversidade de *Bacteria* em um perfil de solo de marisma com diferentes condições físico-químicas. Foram coletadas quatro subamostras, nas camadas de 0-38 cm, 38-78 cm, 78-108 cm e 108-130 cm, representando as camadas óxica/subóxica (OS), subóxica (SO), subóxica com coloração indicativa de presença de oxidróxidos de ferro (Fe) e anóxica (An). Amplicons de rDNA 16S de *Bacteria* e *Archaea* da subamostra de cada camada foram analisadas em DGGE. O rDNA 16S de *Bacteria* das amostras das camadas OS e An foi parcialmente seqüenciado. As estruturas das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* das camadas do solo de marisma apresentaram variações. As estruturas das comunidades de *Bacteria* das subamostras óxica/subóxica e anóxica são estatisticamente diferentes pela análise com o LIBSHUFF. O solo estudado apresenta grande diversidade de *Bacteria*, sendo grande parte desta ainda não caracterizada. Bactérias das ordens *Desulfobacterales*, *Desulfovibrionales* e *Desulfuromonales* podem estar relacionadas com a atividade de sulfato-redução e formação de pirita na camada anaeróbia do perfil do solo de marisma estudado.

Palavras-chave: marisma; solo; diversidade microbiana; microrganismos; *Bacteria*; rDNA 16S; DGGE.

Abstract

Structure of procaryotic communities and bacterial diversity in a marisma soil profile

Bacterial communities participate in biogeochemical processes that occurs in soils of estuarine ecosystems like marisma. Determinations of the bacterial communities structures and diversity can occur in function of different physico-chemical conditions, reflecting in the biogeochemical processes. The aim of this work was to evaluate variations in prokaryotic communities structures and diversity in a marisma soil profile with different physico-chemical conditions. Four samples was collected in depths 0-38 cm, 38-78 cm, 78-108 cm and 108-130 cm, representing oxic/suboxic (OS), suboxic (SO), suboxic with visual presence of Fe oxidroxides (Fe) and anoxic (An) layers. Bacterial and archaeal rDNA 16S amplicons of each layer was analysed with DGGE. Bacterial and archaeal rDNA 16S amplicons of OS and An was partial sequenced. Bacterial and archaeal communities structures show variations with depth. S-LIBSHUFF analysis showed that bacterial and archaeal communities structures of OS and An are statistically different. The soil studied have great unknown bacterial diversity. The orders *Desulfobacterales*, *Desulfovibrionales* and *Desulfuromonales* can participate of sulfate-reduction activity and formation of pirite in anoxic layer.

Keywords: marisma; soil; microbial diversity; microorganisms; *Bacteria*; rDNA 16S; DGGE.

5.1 Introdução

A organização e funcionamento das comunidades microbianas governam vários processos bioquímicos nos solos como formação de húmus, ciclagem de C, N e S, dentre outros (LYNCH; BRAGG, 1985). Alguns dos processos que envolvem as reações de oxi-redução de Fe e S são especialmente importantes em solos de ecossistemas estuarinos como as marismas.

Estes solos, por estarem sob influência de ciclos de inundação de marés, apresentam grandes variações de potencial de oxi-redução. Ao longo de um perfil de solo variando de óxico para anóxico, diferentes processos biogeoquímicos podem a forma como a matéria orgânica será utilizada pelos microrganismos e, conseqüentemente, a estrutura das suas comunidades.

Apesar de vários estudos terem sido realizados em solos e sedimentos de ecossistemas estuarinos (BUCHAN et al., 2003; LANOIL et al., 2005; PURDY et al., 2002; SMITH et al., 2004), a microbiota de solos de marisma ainda é pouco conhecida, bem como o são as relações entre as comunidades microbianas estabelecidas e os processos biogeoquímicos predominantes. Além disso, estes ambientes pouco estudados podem ser considerados um grande banco genético para as pesquisas e desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos, considerando que os microrganismos representam as formas de vida mais abundantes e diversificadas do planeta, detendo a maior proporção da diversidade genética existente (LAMBAIS et al., 2005).

Técnicas moleculares baseadas na análise do DNA extraído diretamente do ambiente têm facilitado estudos de caracterização da diversidade das comunidades microbianas, necessários para o entendimento dos processos biogeoquímicos ou para utilização biotecnológica (BENLLOCH; MARTINEZ-MURCIA; RODRIGUEZ-VALERA, 1995; LAMBAIS et al., 2005). Aliadas aos avanços da bioinformática e dos métodos de análise estatística, estas técnicas têm se mostrado cada vez mais promissoras para estudos de diversidade microbiana em diferentes ambientes (TORSVIK; ØVREÅS, 2002). Estudos de caracterização de estrutura de comunidades de procariotos podem ser feitos utilizando-se a variabilidade nas sequências do rDNA 16S, que pode ser avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) (MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993) e sequenciamento, para estudos mais detalhados de diversidade (CHELIUS; TRIPLETT, 2001; DERAQSHANI; LUKOW, LIESACK, 2001; LAMBAIS et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações das estruturas das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* em solo de marisma de diferentes profundidades, onde processos biogeoquímicos distintos ocorrem, bem como a caracterização da diversidade de sua comunidade de *Bacteria*.

5.2 Desenvolvimento

5.2.1 Material e métodos

5.2.1.1 Área de estudo e amostragem

Foram coletadas amostras em quatro camadas de um perfil de solo de marisma nas profundidades de 0-38 cm, 48-78 cm, 78-108 cm e 108-130 cm, que representam as camadas óxica/subóxica (OS), subóxica (SO), subóxica com coloração indicativa da presença de oxidróxidos de Fe (Fe) e anóxica (Na), respectivamente (informação pessoal – Xosé Luis Otero, Universidade de Santiago de Compostela) (ilustrações no Anexo).

5.2.1.2 Extração do DNA

Para a extração do DNA do solo, utilizou-se o kit FastDNA Spin for Soil (Bio101, Vista, Califórnia) como descrito no item 2.2.1.2

5.2.1.3 PCR-DGGE

As condições de amplificação do rDNA 16S de *Bacteria* e *Archaea* bem como as condições de DGGE e posterior análise estão descritas no item 2.2.1.3.

5.2.1.4 Bibliotecas de rDNA 16S

Para a construção de bibliotecas de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria* das amostras das camadas óxica/subóxica (0-38 cm) e anóxica (108-130 cm) foram utilizados os iniciadores

PRBA63f (5' GGA TCC CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') (MARCHESI et al., 1998) e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREÅS et al., 1997) na PCR. Os amplicons obtidos foram clonados e sequenciados como descrito no item 3.2.1.3.

5.2.1.5 Análises das seqüências de rDNA 16S

A forma como as seqüências de rDNA 16S foram processadas e analisadas, bem como as ferramentas utilizadas estão descritas no item 3.2.1.4.

5.2.2 Resultados

A análise de agrupamento hierárquico com base nos amplicons de rDNA 16S de *Bacteria* e *Archaea* detectados após DGGE é apresentada na figura 5.1a e 5.1b, respectivamente. Os dados mostram que a estrutura das comunidades de bactéria e arqueas nas camadas OS e SO são mais similares entre si do que em relação às camadas Fe e An, as quais também apresentam maior nível de similaridade entre si. Esta alteração ao longo do perfil pode ser facilmente visualizada no DGGE de rDNA 16S de *Archaea* (Figura 5.1b), havendo aumento do número de bandas representando amplicons ricos em G+C nas regiões mais anóxicas.

A análise das seqüências do rDNA 16S das comunidades de Bacteria das camadas OS e An revelou que 28,7% e 45,6% das seqüências, respectivamente, não puderam ser classificadas no nível de filo (Tabela 5.1). Do total de 176 seqüências de rDNA 16S, 36,4% não chegaram a ser classificadas ao nível de filo, sendo que quatro, pertencentes à subamostra da camada An (MRPL), não foram classificadas no domínio *Bacteria*, e podem representar bactérias filogeneticamente divergentes das atualmente classificadas nesse domínio, já que a análise pelo Chimera Check do RDP não revelou tratar-se de quimeras. A Tabela 5.2 mostra a afiliação filogenética feita utilizando-se o RDP Classifier para as seqüências não classificadas em filós pelo RDPquery. Pode-se observar que as seqüências, com poucas exceções, possuem similaridade com seqüências presentes em ambientes marinhos, estuarinos e sedimentares. Metade das seqüências, assim como quando utilizou-se o RDPquery, foi classificada no domínio *Bacteria*. Porém, algumas foram classificadas no filo *Bacteroidetes*, e duas (MRPL053 e MRPL056) no filo *Proteobacteria*. Algumas seqüências que foram classificadas como

pertencentes ao domínio *Bacteria* com o RDPquery não tiveram sua classificação determinada com o RDP Classifier (Tabela 5.2), apesar de, como citado anteriormente, mostrarem similaridade com seqüências encontradas em ambientes correlatos.

Os resultados da afiliação filogenética feita com o RDPquery mostraram que as bactérias do filo *Proteobacteria* estão presentes com maior freqüência, representando aproximadamente 60% e 40% das seqüências no solo mais superficial (MRPU) e mais profundo (MRPL), respectivamente (Figura 5.2a). Seqüências de *Acidobacteria* e *Actinobacteria* foram detectadas apenas em MRPU e *Deferribacteres* apenas em MRPL (Figura 5.2a). Existe uma grande variação na freqüência de ocorrência de seqüências das classes de *Proteobacteria* entre as amostras analisadas (Figura 5.2b). O domínio de *Alphaproteobacteria* que ocorre em MRPU não foi observado em MRPL, onde observou-se um aumento de freqüência de ocorrência de *Gammaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria* (Figura 5.2b).

As estimativas de UTOs indicam não haver diferença significativa na diversidade de *Bacteria* em MRPU e MRPL (Tabela 5.3). As estimativas de número de filotipos de *Bacteria* são maiores para MRPU na maioria das distâncias evolutivas, não diferindo estatisticamente até $d = 0,03$ (Figura 5.4). Já, os índices de diversidade estimados indicam diferenças significativas, sendo maiores na camada mais superficial (Tabela 5.3).

A comparação das comunidades bacterianas de MRPU e MRPL, utilizando o programa S-LIBSHUFF, mostrou que essas comunidades são significativamente diferentes, já que os valores de p calculados foram de 0,0000, quando ocomparadas as curvas de cobertura homólogas (valores de p mínimos de 0,005 e 0,025, para 1% e 5% de probabilidade, respectivamente).

5.2.3 Discussão

Considerando algumas exceções, citadas a seguir, os táxons encontrados pela classificação com o RDPquery nas subamostras OS e An do solo de marisma (Tabela 5.1) correspondem àqueles encontrados nos solos de marisma e mangue, descritos anteriormente (capítulo 3).

Quatro gêneros não encontrados nos solos do estudo do capítulo 3 foram encontrados neste. Dentro do filo *Bacteroidetes*, o gênero *Marinilabilia* (família *Rikenellaceae*), encontrado

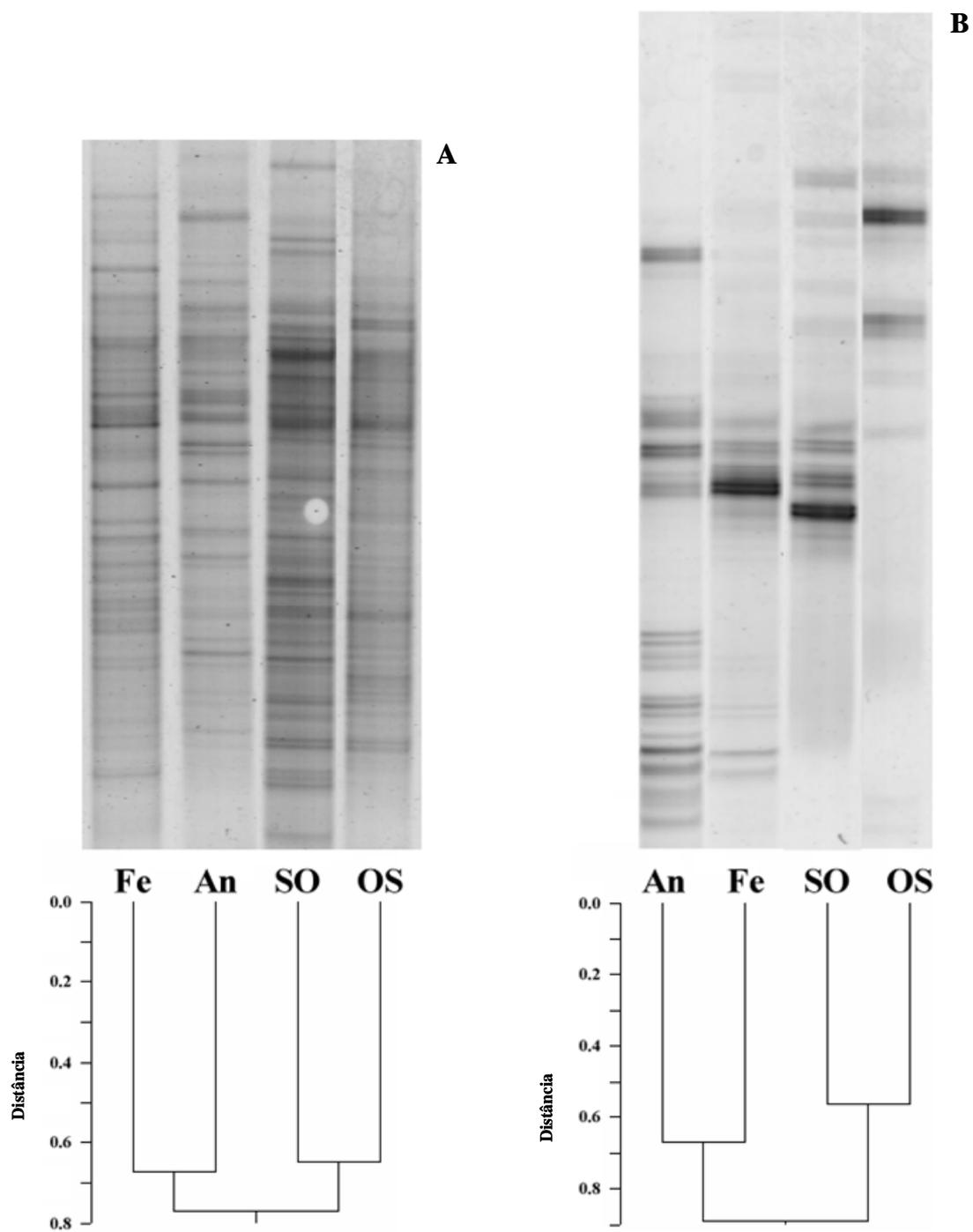


Figura 5.1 – Agrupamento hierárquico de amplicons de rDNA 16S de *Bacteria* (A) e *Archaea* (B) analisados por DGGE em subamostras representando as camadas óxica/subóxica (0-38 cm), subóxica (48-78 cm), de intensa metabolização de óxidos e hidróxidos de Fe (78-108 cm) e anóxica (108-130 cm) de um perfil de solo de marisma

Tabela 5.1 – Frequências (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados nas camadas óxica/subóxica (0-38 cm) e anóxica (108-130 cm) de solo de marisma alta

						(Continua)	
Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	MRPU	MRPL	
ND	ND	ND	ND	ND	28,7	45,6	
Actinobacteria	Actinobacteria	ND	ND	ND	1,9	0,0	
Bacteroidetes	ND	ND	ND	ND	1,8	4,4	
Bacteroidetes	Bacteroidetes	Bacteroidales	ND	ND	0,0	1,4	
Bacteroidetes	Bacteroidetes	Bacteroidales	Rikenellaceae	ND	0,0	1,4	
				Marinilabilia	0,0	1,4	
Bacteroidetes	Flavobacteria	ND	ND	ND	0,9	0,0	
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	ND	2,8	0,0	
				Flavobacterium	0,9	0,0	
Bacteroidetes	Sphingobacteria	ND	ND	ND	4,6	0,0	
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0,9	0,0	
Firmicutes	ND	ND	ND	ND	0,0	4,2	
Firmicutes	Clostridia	ND	ND	ND	0,0	2,9	
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	ND	ND	ND	0,9	0,0	
Nitrospira	ND	ND	ND	ND	0,0	0,0	
Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	ND	ND	0,0	1,4	
Proteobacteira	ND	ND	ND	ND	6,5	0,0	
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND	ND	ND	14,9	5,8	
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	11,1	0,0	
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	ND	0,9	0,0	

Tabela 5.1 – Frequências (%) dos diferentes táxons* de *Bacteria* encontrados nas camadas óxica/subóxica (0-38 cm - MRPU) e anóxica (108-130 cm - MRPL) de solo de marisma alta

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	(Conclusão)	
					MRPU	MRPL
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	ND	1,8	1,8
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	ND	0,9	1,4
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	ND	ND	0,9	0,0
				Hyphomonas	0,9	0,0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ND	ND	0,9	0,0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	ND	0,9	0,0
				Sphingomonas	1,8	0,0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	ND	ND	ND	0,9	0,0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	ND	1,8	0,0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	ND	ND	ND	1,8	8,8
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	ND	ND	0,0	1,4
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	Desulfobacteraceae	ND	0,0	1,4
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	ND	ND	0,0	1,4
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonales	Desulfuromonaceae	ND	0,0	1,4
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND	ND	ND	7,4	7,3
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	ND	0,9	0,0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	ND	ND	0,9	0,0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia	0,0	1,4
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Cellvibrio	0,9	0,0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	ND	ND	0,0	5,8

Tabela 5.2 – Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de rDNA 16S de *Bacteria*, não enquadradas em nenhum filo pelo RDPquery, encontradas nas camadas óxica/subóxica (0-38 cm - MRPU) e anóxica (108-130 cm - MRPL) de solo de marisma alta

(Continua)

Seqüência	Classificação* ¹	ID (%)* ²	e-value* ³	Acesso* ⁴	Autor* ⁵	Organismo / Ambiente
MRPL059	<i>Bacteria</i>	87,9	2,00E-129	AB177173.1	INAGAKI et al., 2006	procariotos – sedimento oceânico
MRPU011	<i>Bacteria</i>	85,8	1,00E-111	AB187998.1	TAKAKU et al., 2006	procariotos – compostagem - lixo
MRPU004	Filo <i>Bacteroidetes</i>	85,6	2,00E-134	AB188080.1	* ⁷	
MRPU006	<i>Flexibacteraceae</i>	90,1	6,00E-145	AB188081.1		
MRPU008	Filo <i>Bacteroidetes</i>	89,7	2,00E-139	AB188082.1		
MRPU014	Filo <i>Bacteroidetes</i>	88,0	2,00E-124			
MRPU081	<i>Bacteria</i>	87,3	2,00E-124	AB234252.1	HIRAISHI et al., 2005	procariotos – sedimento contaminado
MRPL047	<i>Bacteria</i>	83,0	5,00E-111	AF286032.1	KOSTKA et al., 2004 (np)* ⁸	procariotos – sedimento contaminado
MRPL049	<i>Bacteria</i>	88,5	4,00E-157	AF361657.1	HEIJS et al., 2004 (np)	procariotos – rocha oceânica
MRPU084	<i>Bacteria</i>	87,1	5,00E-146	AF365826.1	ROHWER, 2004 (np)	procariotos - coral
MRPU095	ND* ⁶	81,0	4,00E-22	AF407716.1	SPANEVELLO; PATEL, 2004 (np)	Procariotos – lençol freático
MRPU016	<i>Bacteria</i>	92,0	1,00E-147	AF432647.1	HARRIS et al., 2003 (np)	<i>Bacteria</i>
MRPU104	<i>Bacteria</i>	95,1	7,00E-179	AF432769.1	CHOW et al., 2002	<i>Bacteria</i> – rizosfera de <i>Pinus contorta</i>
MRPL053	<i>Proteobacteria</i>	92,3	8,00E-124	AJ299989.1	HORZ; YIMGA; LIESACK, 2001	metanotróficos – rizosfera - arroz
MRPL068	ND	81,5	2,00E-54	AJ302704.1	GOLYSHIN et al., 2000 (np)	<i>Oleiphilus messinensis</i> - marinho
MRPU086	<i>Bacteria</i>	92,5	1,00E-157	AJ863287.1	GRAFF; CONRAD, 2005	<i>Bacteria</i> – solo com inundação
MRPU108	ND	82,8	2,00E-65	AY037584.1	FURLONG et al., 2002	procariotos - solo
MRPL058	<i>Bacteria</i>	90,0	1,00E-171	AY043959.1	AXELROOD et al., 2002	<i>Bacteria</i> – solo florestal impactado
MRPU103	<i>Bacteria</i>	92,3	0.0	AY095422.1	DING et al., 2004 (np)	procariotos - biofiltro
MRPU101	ND	90,7	3,00E-93	AY154528.1	SINGLETON et al., 2003	<i>Bacteria</i> – intestino de minhoca
MRPU092	ND	86,4	3,00E-118	AY214798.1	LILES et al., 2003	procariotos - solo
MRPL012	<i>Bacteria</i>	91,6	0.0	AY304371.1	KIM et al., 2004	<i>Bacteria</i> - sedimento
MRPL045	<i>Bacteria</i>	87,9	4,00E-127			
MRPU093	<i>Bacteria</i>	82,8	9,00E-69	AY515410.1	STEVENS et al., 2005	<i>Bacteria</i> – solo estuarino
MRPU091	ND	89,3	4,00E-87	AY568861.1	CHO; HYUN; LEE, 2004 (np)	<i>Bacteria</i> – solo estuarino
MRPL060	<i>Bacteria</i>	86,4	2,00E-149	AY592604.1	HEIJS; LAVERMAN; FORNEY, 2004 (np)	procariotos – sedimento oceânico
MRPL063	<i>Bacteria</i>	86,6	1,00E-151			
MRPU098	ND	79,0	1,00E-51	AY682383.1	KWON et al., 2005 (np)	<i>Bacteria</i> – sedimento estuarino
MRPU106	ND	80,5	2,00E-64	AY710627.1	MORAN; WHITMAN; YE, 2004 (np)	procariotos – salt marsh

Tabela 5.2 – Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de rDNA 16S de *Bacteria*, não enquadradas em nenhum filo pelo RDPquery, encontradas nas camadas óxica/subóxica (0-38 cm - MRPU) e anóxica (108-130 cm - MRPL) de solo de marisma alta

(Continuação)

Seqüência	Classificação* ¹	ID (%)* ²	e-value* ³	Acesso* ⁴	Autor* ⁵	Organismo / Ambiente
MRPL004	Filo <i>Bacteroidetes</i>	93,9	4,00E-171	AY710818.1		
MRPL006	Filo <i>Bacteroidetes</i>	96,3	0.0			
MRPL042	<i>Bacteria</i>	97,3	0.0	AY710875.1		
MRPL046	<i>Bacteria</i>	97,1	0.0			
MRPL055	<i>Bacteria</i>	97,3	0.0			
MRPU090	<i>Bacteria</i>	94,7	1,00E-162	AY711030.1		
MRPU082	<i>Bacteria</i>	97,2	0.0	AY711293.1		
MRPL056	<i>Proteobacteria</i>	92,1	1,00E-141	AY711557.1		
MRPU088	ND	100	3,00E-04	AY711917.1		
MRPU100	<i>Bacteria</i>	79,3	9,00E-19	AY752782.1	LIN et al., 2005	<i>Geobacteraceae</i> – aquífero (Fe-redução)
MRPU089	<i>Bacteria</i>	92,7	0.0	AY793685.1	RADL; SCHLOTTER; MUNCH, 2004 (np)	procariotos – sedimento de lago
MRPL067	<i>Bacteria</i>	87,7	2,00E-100	DQ110110.1	WEBER et al., 2006	procariotos – sedimento (ciclo do Fe)
MRPU096	ND	82,6	3,00E-68	DQ154824.1	DILLON et al., 2005 (np)	<i>Bacteria</i> - hipersalino
MRPU083	<i>Bacteria</i>	91,3	0.0	DQ300755.1	DeLONG et al., 2006	procariotos - oceano
MRPU097	<i>Bacteria</i>	87,6	8,00E-144	DQ329895.1	LEY et al., 2006	procariotos - hipersalino
MRPL062	<i>Bacteria</i>	91,7	0.0	DQ394934.1	ZHANG; QIAN 2006 (np)	procariotos - sedimento
MRPL043	<i>Bacteria</i>	94,2	0.0	DQ394964.1		
MRPU099	<i>Bacteria</i>	91,7	0.0	DQ404821.1	ABULENCIA et al., 2006	procariotos – sedimento contaminado
MRPU079	<i>Bacteria</i>	93,8	1,00E-167	DQ407301.1	FIELDS; YAN; ZHOU, 2006	<i>Bacteria</i> – contaminado com lixo
MRPU085	<i>Bacteria</i>	não encontrado	-	-	-	-
MRPU087	ND					
MRPU094	ND					
MRPU102	ND					
MRPU107	ND					
MRPL038	ND					
MRPL044	ND					
MRPL048	ND					
MRPL050	ND					
MRPL051	ND					
MRPL057	ND					

Tabela 5.2 – Classificação taxonômica pelo RDP Classifier e características da seqüência de maior similaridade determinada pelo megablast do NCBI para seqüências de rDNA 16S de *Bacteria*, não enquadradas em nenhum filo pelo RDPquery, encontradas nas camadas óxica/subóxica (0-38 cm - MRPU) e anóxica (108-130 cm - MRPL) de solo de marisma alta

(Continuação)

Seqüência	Classificação* ¹	ID (%)* ²	e-value* ³	Acesso* ⁴	Autor* ⁵	Organismo / Ambiente
MRPL064	ND					
MRPL065	ND					
MRPL066	ND					
MRPL054	ND					
MRPL061	<i>Bacteria</i>					

*1 – Menor táxon definido com o RDP Classifier do RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) com nível máximo de restrição (Confidence threshold – 95%); *2 – Valor de identidade entre as seqüências estudada e a de maior similaridade no banco de dados; *3 – e-value entre as seqüências estudada e a de maior similaridade no banco de dados; *4 – Número de acesso da seqüência de maior similaridade no banco de dados; *5 – Autores do trabalho do qual se originou a seqüência de maior similaridade; *6 – Não determinado; *7 – A linha em branco representa a repetição da linha anterior; *8 – Trabalho não publicado

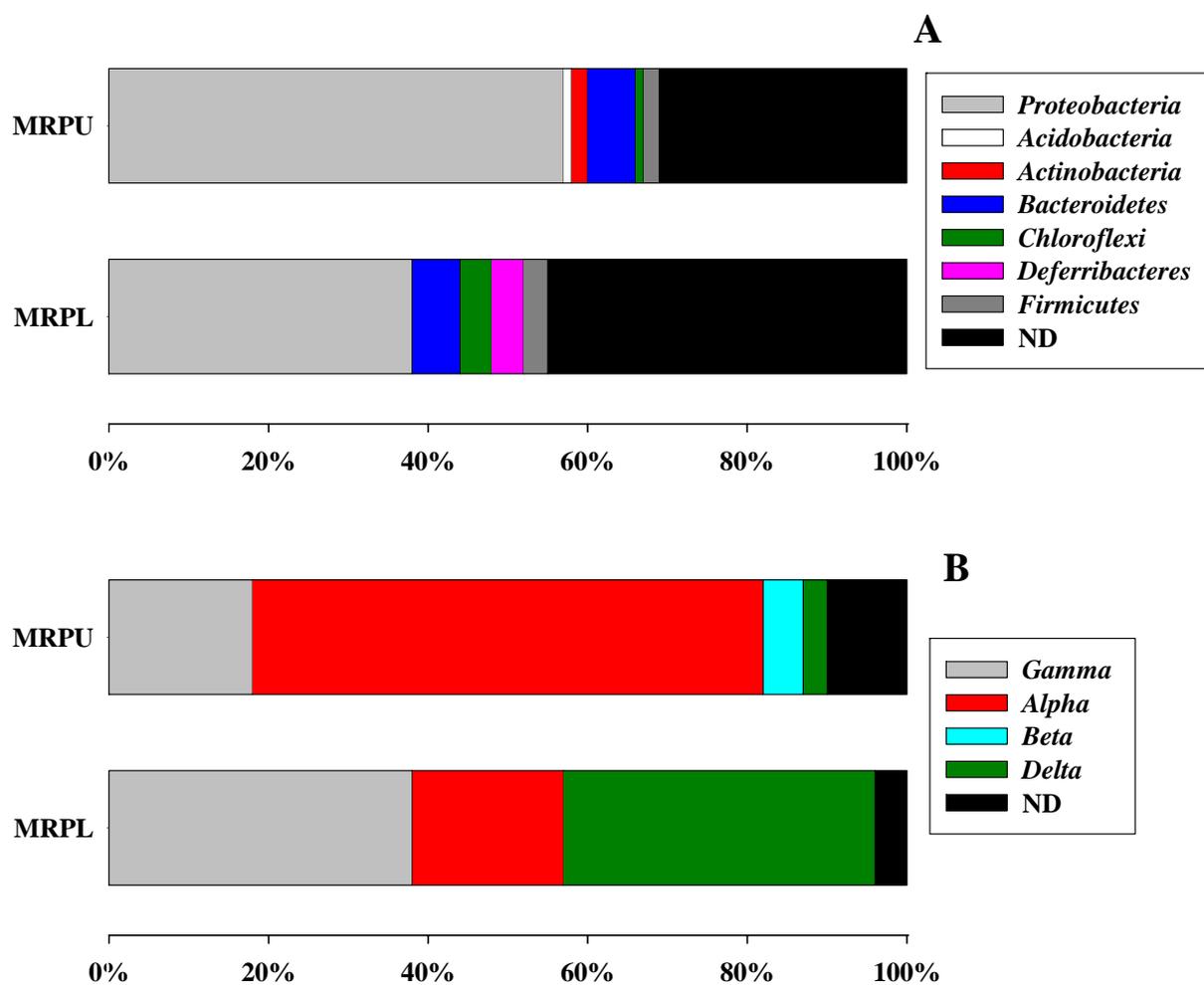


Figura 5.2 – Ocorrência relativa de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria* dos diferentes filos (A) e das classes de *Proteobacteria* (B) nas camadas óxica/subóxica (0-38 cm - MRPU) e anóxica (108-130 cm - MRPL) de solo de marisma alta

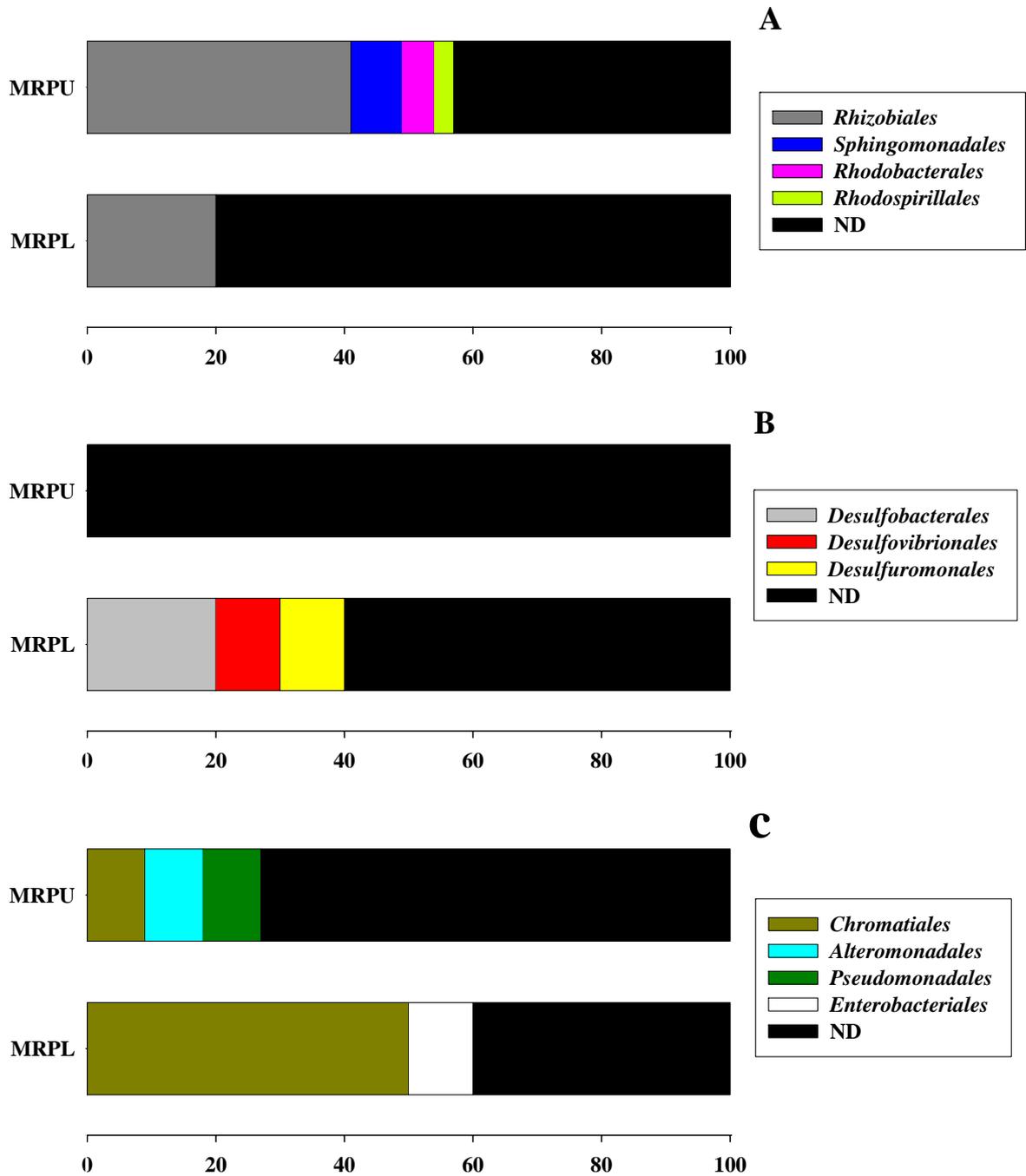


Figura 5.3 – Ocorrência relativa de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria* das ordens de *Alphaproteobacteria* (A), *Deltaproteobacteria* (B) e *Gammaproteobacteria* (C) nas camadas óxica/subóxica (0-38 cm - MRPU) e anóxica (108-130 cm - MRPL) de solo de marisma alta

Tabela 5.3 – Índices de diversidade de *Bacteria* e estimativas de número de UTOs e cobertura de amostragem para as subamostras das camadas óxica/subóxica (0-38 cm - MRPU) e anóxica (108-130 cm - MRPL) de um perfil de solo de marisma alta

Comunidade	NS	NU	Estumativa de UTOs		Índices de Diversidade		ECA
			ACE	Chao1	Shannon ^a	1/D ^b	
D = 0.01							
MRPU	108	107	5778 (1192; 29744)	5725 (1182; 29470)	4,67 (4,65; 4,69)	106,0 (89,2; 130,7)	0,019
MRPL	68	65	737 (290; 2073)	706 (271; 2061)	4,16 (4,11; 4,21)	62,5 (50,1; 81,7)	0,088
D = 0.03							
MRPU	108	101	779 (416; 1559)	732 (381; 1522)	4,59 (4,55; 4,64)	95,6 (80,7; 117,2)	0,130
MRPL	68	61	296 (167; 585)	269 (148; 562)	4,08 (4,01; 4,14)	56,4 (46,0; 72,9)	0,206

^aEstimador de máxima semelhança. ^bRecíproco do índice de Simpson – estimador de máxima semelhança. NU, número de UTOs. ECA, estimativa de cobertura de amostragem. Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança

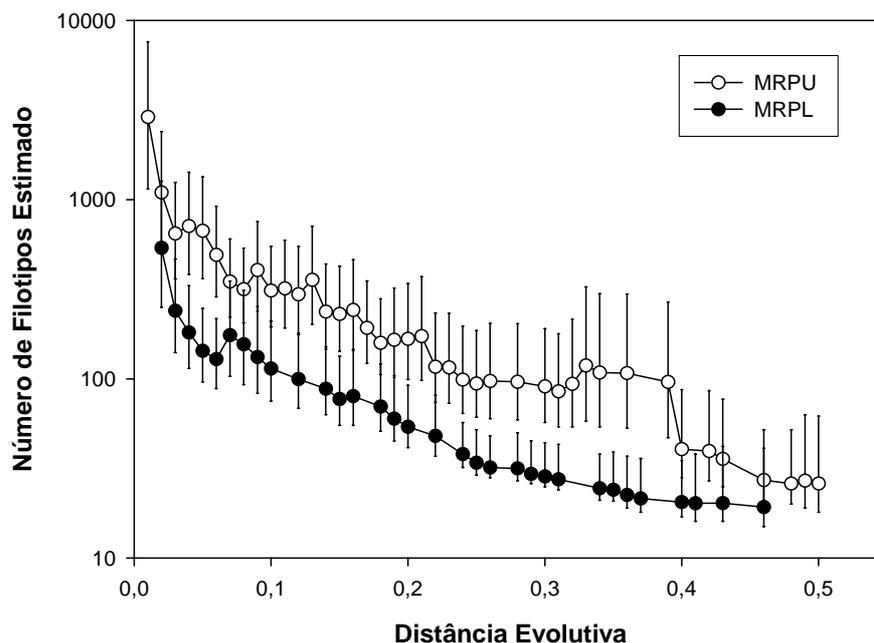


Figura 5.4 – Números de filotipos de *Bacteria* estimado para diferentes distâncias evolutivas nas camadas óxica/subóxica (0-38 cm – MRPU) e anóxica (108-130 cm – MRPL) de solo de marisma utilizando-se o estimador não-paramétrico Chao1. As barras representam o intervalo com 95% de confiança

em MRPL, engloba espécies anaeróbias facultativas de origem marinha (SUZUKI et al., 1999). Em MRPU foi encontrada uma seqüência de *Bacillus* (filo *Firmicutes*), gênero ubíquo na natureza, comumente encontrado em solos e intensamente estudado devido ao potencial de utilização biotecnológica de compostos secundários. Tem importância ambiental como degradador de uma grande quantidade de compostos orgânicos (KUNST et al., 1997). Também em MRPU foram encontradas duas seqüências classificadas como *Sphingomonas*, que compreende bactérias gram-negativas, quimiorganotróficas e estritamente aeróbias (YABUUCHI et al., 1990, 1999). Este grupo foi recentemente redefinido devido à sua grande diversidade genética (TAKEUCHI; HAMANA; HIRAISHI, 2001), sendo encontrado em uma grande quantidade de ambientes, inclusive solos. Uma seqüência classificada como *Cellvibrio*, gênero comumente encontrado em solos, foi encontrada em MRPU. Bactérias deste grupo, incluindo espécies geneticamente modificadas, vêm sendo estudadas pelo potencial de utilização na degradação enzimática de polissacarídeos em processos industriais (PROCTOR et al., 2005).

Além destes gêneros, também foram encontrados outros táxons não descritos no capítulo 3. Em *Alphaproteobacteria*, duas famílias da ordem *Rhizobiales*: *Methylocystaceae*, que engloba

espécies metanotróficas (BÉDARD; KNOWLES, 1989; HANSON; HANSON, 1996), e *Phyllobacteriaceae*, que inclui espécies desnitrificadoras isoladas de ambientes marinhos (LABBÉ; PARENT; VILLEMUR, 2004), foram encontradas em MRPU e MRPL (Tabela 5.1). Duas seqüências encontradas em MRPU foram classificadas como *Rhodocyclaceae* (*Betaproteobacteria*, *Rhodocycles*), a qual também engloba bactérias desnitrificadoras (GINIGE; KELLER; BLACKALL, 2005). Uma seqüência classificada como *Alteromonadaceae* (*Gammaproteobacteria*, *Alteromonadales*), família de bactérias marinhas gram-negativas, quimiorganotróficas, aeróbias ou anaeróbias facultativas (IVANOVA; FLAVIER; CHRISTEN, 2004), foi detectada em MRPU (Tabela 5.1).

Seqüências classificadas nas ordens de sulfato-redutores *Desulfobacterales*, *Desulfovibrionales* e *Desulfuromonales* foram encontradas apenas na amostra da camada anóxica (Figura 5.3). Os microrganismos destes grupos podem estar envolvidos no processo de formação de pirita em An, que ocorre com menor intensidade nas demais camadas. As maiores concentrações de S total e Fe pirítico em An reforçam esta hipótese (Figuras 5.5a e 5.5b).

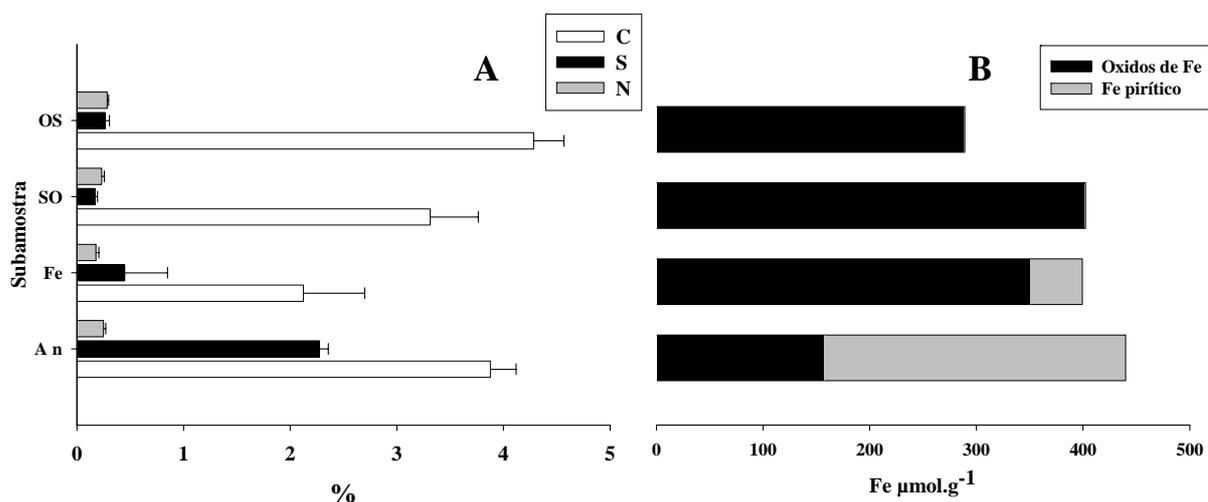


Figura 5.5 – Teores de C, S e N totais (A) e concentrações de Fe na forma de óxidos e pirítica determinadas por extração seqüencial (B) nas subamostras referentes às camadas óxica/subóxica (OS), subóxica (SO), de coloração indicativa da presença de oxidróxidos de Fe (Fe) e anóxica (An). Dados obtidos por Xose Luis Otero – Universidade de Santiago de Compostela

5.3 Conclusões

As estruturas das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* das camadas do solo de marisma apresentaram variações.

As estruturas das comunidades de *Bacteria* das subamostras óxica/subóxica e anóxica são estatisticamente diferentes.

O solo estudado apresenta grande diversidade de *Bacteria*, sendo grande parte desta ainda não caracterizada.

Bactérias das ordens *Desulfobacterales*, *Desulfovibrionales* e *Desulfuromonales* podem estar relacionadas com a atividade de sulfato-redução e formação de pirita na camada anaeróbia do perfil do solo de marisma estudado.

Referências

ABULENCIA, C.B.; WYBORSKI, D.L.; GARCIA, J.A.; PODAR, M.; CHEN, W.; CHANG, S.H.; CHANG, H.W.; WATSON, D.; BRODIE, E.L.; HAZEN, T.C.; KELLER, M. Environmental whole-genome amplification to access microbial populations in contaminated sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3291-3301, 2006.

AXELROOD, P.E.; CHOW, M.L.; RADOMSKI, C.C.; McDERMOTT, J.M.; DAVIES, J. Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance. **Canadian Journal of Microbiology**, Ontario, v. 48, p. 655-674, 2002.

BÉDARD, C.; KNOWLES, R. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, p. 68-84, 1989.

BENLLOCH, S.; MARTINEZ-MURCIA, A.J.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Sequencing of bacterial and archaeal 16S rDNA genes directly amplified from a hypersaline environment. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 18, p. 574-581, 1995.

BUCHAN, A.; NEWELL, S.Y.; BUTLER, M.; BIERS, E.J.; HOLLIBAUGH, J.T.; MORAN, M.A. Dynamics of bacterial and fungal communities on decaying salt marsh grass. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 6676-6687, 2003.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of *Archaea* and *Bacteria* in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York v. 41, p. 252-263, 2001.

DERAKSHANI, M.; LUKOW, T.; LIESACK, W. Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rDNA genes from bulk soil

and rice roots of flooded rice microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 623-631, 2001.

CHOW, M.L.; RADOMSKI, C.C.; McDERMOTT, J.M.; DAVIES, J.; AXELROOD, P.E. Molecular characterization of bacterial diversity in lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing in disturbance and geographic source. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 42, p. 347-357, 2002.

DeLONG, E.F.; PRESTON, C.M.; MINCER, T.; RICH, V.; HALLAM, S.J.; FRIGAARD, N.U.; MARTINEZ, A.; SULLIVAN, M.B.; EDWARDS, R.; BRITO, B.R.; CHISHOLM, S.W.; KARL, D.M. Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. **Science**, Washington, v. 311, p. 496-503, 2006.

FURLONG, M.A.; SINGLETON, D.R.; COLEMAN, D.C.; WHITMAN, W.B. Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1265-1279, 2002.

GINIGE, M.P.; KELLER, J.; BLACKALL, L.L. Investigation of an acetate-fed denitrifying microbial community by stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent in situ hybridization-microautoradiography. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 8683-8691, 2005.

GRAFF, A.; CONRAD, R. Impact of flooding on soil bacterial communities associated with poplar, (*Papulus* sp.) trees. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 53, p. 401-415, 2005.

HANSON, R.S.; HANSON, T.E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, p. 439-471, 1996.

HIRAIISHI, A.; KAIYA, S.; MIYAKODA, H.; FUTAMATA, H. Biotransformation of polychlorinated dioxins and microbial community dynamics in sediment microcosms at different contamination levels. **Microbes and Environments**, Kyoto, v. 20, p. 227-242, 2005.

HORZ, H.P.; YIMGA, M.T.; LIESACK, W. Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4177-4185, 2001.

INAGAKI, F.; NUNOURA, T.; NAKAGAWA, S.; TESKE, A.; LEVER, M.; LAUER, A.; SUZUKI, M.; TAKAI, K.; DELWICHE, M.; COLWELL, F.S.; NEALSON, K.H.; HORIKOSHI, K.; D'HONDT, S.; JORGENSEN, B.B. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 2815-2820, 2006.

IVANOVA, E.P.; FLAVIER, S.; CHRISTEN, R. Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like proteobacteria: emended description of the family *Alteromonadaceae* and

proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov., *Colwelliaceae* fam. nov., *Shewanellaceae* fam. nov., *Moritellaceae* fam. nov., *Ferrimonadaceae* fam. nov., *Idiomarinaceae* fam. nov. and *Psychromonadaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 1773-1788, 2004.

KIM, B.S.; OH, H.M.; KANG, H.; PARK, S.S., CHUN, J. Remarkable bacterial diversity in the tidal sediment as revealed by 16S rDNA analysis. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 14, p. 205-211, 2004.

KUNST, F. et al. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature**, London, v. 390, p 249-256, 1997.

LABBÉ, N.; PARENT, S.; VILLEMUR, R. *Nitratireductor aquibiodomus* gen. nov., sp. nov., a novel α -proteobacterium from the marine denitrification system of the Montreal Biodome (Canada). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 269 – 273, 2004.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos Paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L. R. F.; COOPER, M.; SILVA, A. P.; CARDOSO, E. J.. (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 43-84.

LANOIL, B.D.; La DUC, M.T.; WRIGHT, M.; KASTNER, M.; NEALSON, K.H.; BARTLETT, D. Archaeal diversity in ODP legacy borehole 892b and associated seawater and sediments of the Cascadia Margin. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 54, p. 167-177, 2005.

LEY, R.E.; HARRIS, J.K.; WILCOX, J.; SPEAR, J.R.; MILLER, S.R.; BEBOUT, B.M.; MARESCA, J.A.; BRYANT, D.A.; SOGIN, M.L.; PACE, N.R. Unexpected diversity and complexity of the gerrero negro hypersaline microbial mat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 3685-3695, 2006.

LILES, M.R.; MANSKE, B.F.; BINTRIM, S.B.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 2684-2691, 2003.

LIN, B.; BRASTER, M.; VanBREUKELN, B.M.; VanVERSEVELD, H.W.; WESTERHOFF, H.V.; ROLING, W.F. Geobacteraceae community composition is related to hydrochemistry and biodegradation in an iron-reducing aquifer polluted by neighboring landfill. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 5983-5991, 2005.

LYNCH, J.M.; BRAGG, E. Microorganism and soil aggregate stability. In: STEWART, B.A. (Ed.). **Advances in Soil Science**, v. 2. New York: Springer verlag, 1985. p. 133-171.

MARCHESI, J.R.; TAKUICHI, S.; WEIGHTMAN, A.J.; MARTIN, T.A.; FRY, J.C.; HIOM, S.J.; WADE, W.G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 795-799, 1998.

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

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L. TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

PROCTOR, M.R.; TAYLOR, E.J.; NURIZZO, D.; TURKENBURG, J.P.; LLOYD, R.M.; VARDAKOU, M.; DAVIES, G.J.; GILBERT, H.J. Tailored catalysts for plant cell-wall degradation: redesigning the exo-endo preference of *Cellvibrio japonicus* arabinanase 43A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, p. 2697-2702, 2005.

PURDY, K.J.; MUNOSON, M.A.; NEDWELL, D.B.; EMBLEY, T.M. Comparison of the molecular diversity of the methanogenic community at the brackish and marine ends of a UK estuary. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 39, p. 17-21, 2002.

SINGLETON, D.R.; HENDRIX, P.F.; COLEMAN, D.C.; WHITMAN, W.B. Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (*Lumbricidae*; *Oligochaeta*). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford v. 35, p. 1547-1555, 2003.

SMITH, A.C.; KOSTKA, J.E.; DEVEREUX, R.; YATES, D.F. Seasonal composition and activity of sulfate-reducing prokaryotic communities in seagrass bed sediments. **Aquatic Microbial Ecology**, New York, v. 37, p.183-195, 2004.

STEVENS, H.; STUBNER, M.; SIMON, M.; BRINKHOFF, T. Phylogeny of Proteobacteria and Bacteroidetes from oxic habitats of a tidal flat ecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 54, p. 351-365, 2005.

SUZUKI, M.; NAKAGAWA, Y.; HARAYAMA, S.; YAMAMOTO, S. Phylogenetic analysis of genus *Marinilabilia* and related bacteria based on the amino acid sequences of GyrB and emended description of *Marinilabilia salmonicolor* with *Marinilabilia agarovorans* as its subjective synonym. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 49, p. 1551-1557, 1999.

TAKAKU, H.; KODAIRA, S.; KIMOTO, A.; NASHIMOTO, M.; TAKAGI, M. Microbial communities in the garbage composting with rice hull as a amendment revealed by culture-dependent and -independent approaches. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 101, p. 42-50, 2006.

TAKEUCHI, M.; HAMANA, K.; HIRAISHI, A. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of

phylogenetic and chemotaxonomic analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 51, p. 1405-1417, 2001.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, p.240-245, 2002.

WEBER, K.A.; URRUTIA, M.M.; CHURCHILL, P.F.; KUKKADAPU, R.K.; RODEN, E.E. Anaerobic redox cycling of iron by freshwater sediment microorganisms. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 100-113, 2006.

YABUUCHI, E.; YANO, I.; OYAIZU, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; YAMAMOTO, H. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 34, p. 99-119, 1990.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; NAKA, T.; SUZUKI, S.; YANO, I. Proposal of *Sphingomonas suberifaciens* (vanBruuggen, Jochimsen and Brown 1990) comb. nov., *Sphingomonas natatoria* (Sly 1985) comb. nov., and emendation of the genus *Sphingomonas*. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 43, p. 339-349, 1999.

ANEXO



<http://www.guianet.com.br/sp/mapasp.htm>



<http://www.ambiente.sp.gov.br/ppma/cardoso.gif>

Localização da Região do complexo estuarino de Iguape e Cananéia.



Visão parcial do Complexo estuarino de Iguape e Cananéia com a localização das florestas de mangue do Rio Ipaneminha (25°04'44''S e 47°56'14''W), Rio Sítio Grande (25°04'48''S e 47°56'54''W) Ilha de Pai Matos (24°59'48''S e 47°54'19''W)



Visão parcial do Complexo estuarino de Iguape e Cananéia com a localização das florestas de mangue do Rio Ipaneminha (25°04'44''S e 47°56'14''W) e Rio Sítio Grande (25°04'48''S e 47°56'54''W)



Áreas do manguezal do Rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso, SP) dominadas por diferentes tipos de vegetação (R: *Rhizophora mangle*; M: mangue misto, com *Rhizophora mangle* e *Avicennia schaueriana*; T: transição entre mangue misto e a área de restinga; S: *Spartina alterniflora*) e leito de canal (C).

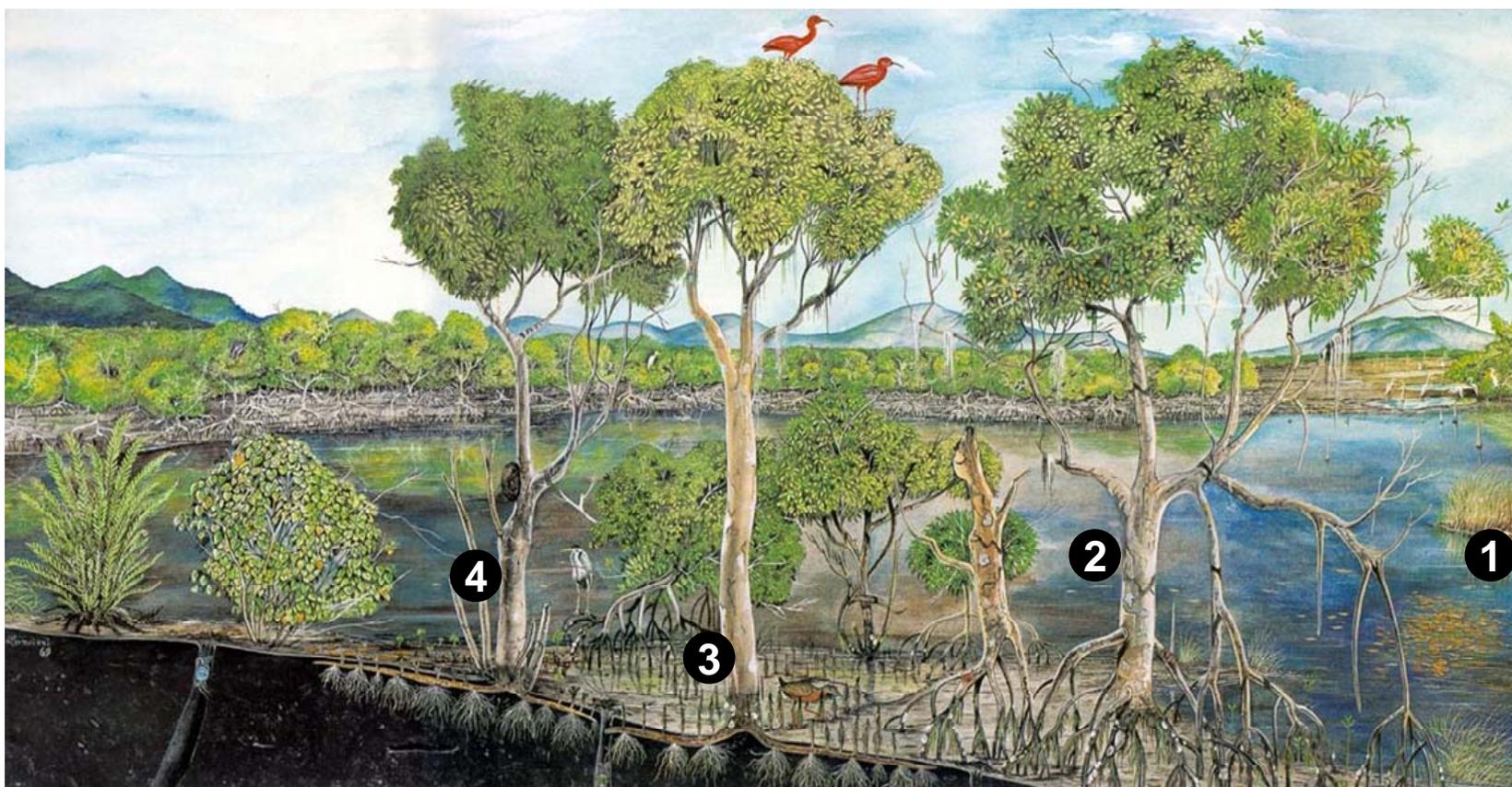


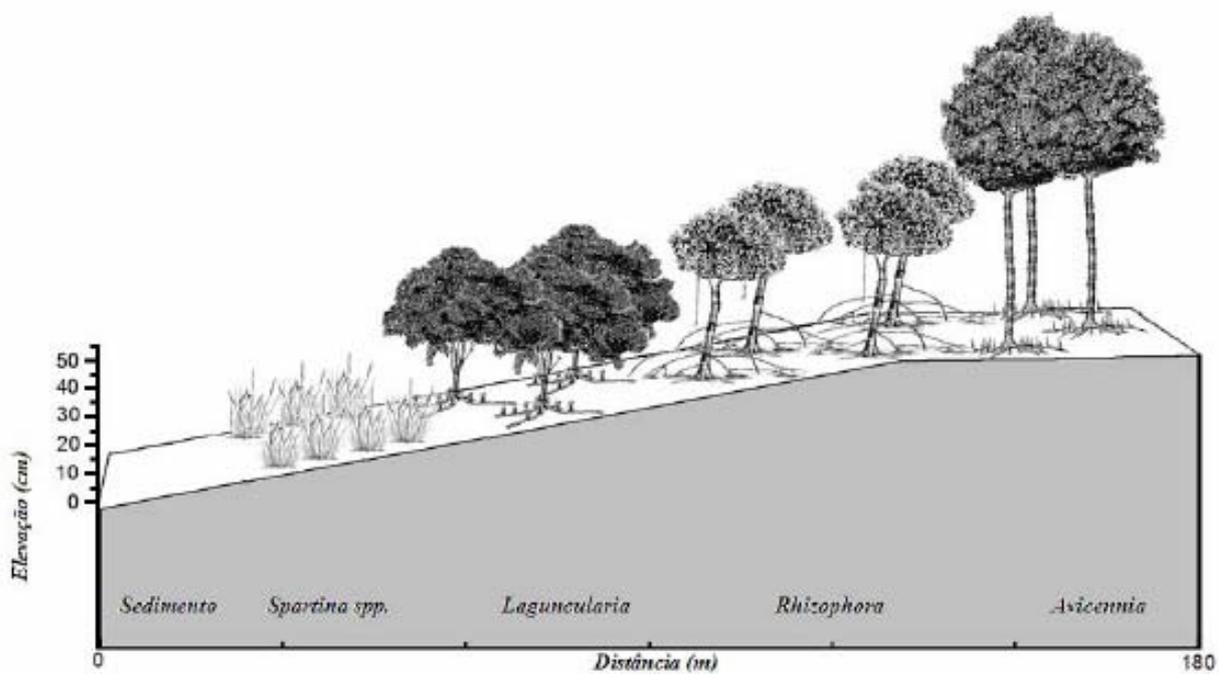
Ilustração com algumas espécies vegetais que ocorrem nos manguezis (1: *Spartina alteriflora*; 2: *Rhizophora mangle*; 3: *Avicennia schaueriana*; 4: *Laguncularia racemosa*). Modificado de: Sérgio de Almeida Rodrigues (O manguezal e a sua fauna - <http://www.usp.br/cebimar/artigos/mangue.html>), Centro de Biologia Marinha (CEBIMAR - <http://www.usp.br/cebimar>)



Áreas do manguezal do Rio Ipaneminha (Ilha do Cardoso, SP) dominadas por diferentes tipos de vegetação (R: *Rhizophora mangle*; M: mangue misto, com *Rhizophora mangle* e *Avicennia schaueriana*; T: transição entre mangue misto e a área de restinga; S: *Spartina alterniflora*) e leito de canal (C).



Áreas da Ilha de Pai Matos (1) com sedimento sem vegetação e com *Spartina alterniflora* (2), *Rhizophora mangle* (3) e *Avicennia schaueriana* (4)



Representação gráfica dos diferentes compartimentos de vegetação da Ilha de Pai Matos (FERREIRA, 2006)

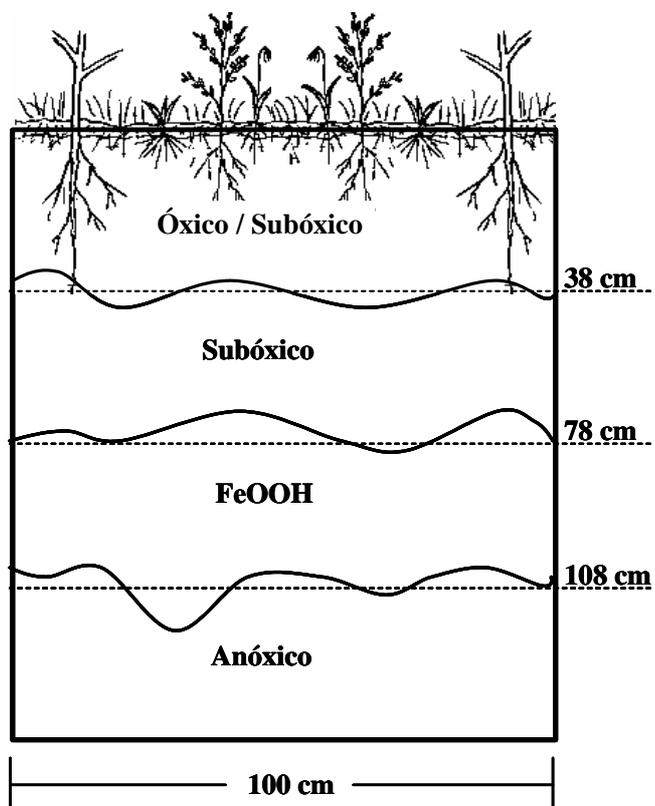


Imagem e esquema de amostragem de perfil de solo de marisma alta