

**Universidade de São Paulo
Centro de Energia Nuclear na Agricultura**

**Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades
microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso-SP**

Lucas William Mendes

**Piracicaba
2009**

Lucas William Mendes

Biólogo

Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso-SP

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Siu Mui Tsai

**Piracicaba
2009**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Mendes, Lucas William

Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso-SP / Lucas William Mendes; orientador Siu Mui Tsai. - - Piracicaba, 2009.

141 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biologia molecular 2. DNA 3. Ecologia microbiana 4. Ecossistemas de mangue 5. Microbiologia do solo I. Título

CDU 579.26

Dedico este trabalho às pessoas responsáveis pela minha formação, educação, caráter e alegria: Edison, Cidinha, Rodrigo e Ana Paula.

Agradecimentos

primeiramente a **Deus**, por guiar, cuidar e estar presente em todos os momentos me ajudando a vencer | aos **meus pais** edison e cidinha, pelo apoio e criação, ajudando na formação do meu caráter, sempre me apoiando nas minhas decisões | aos **meus irmãos** rodrigo e paulinha, pela ajuda sempre precisa, pelos conselhos e pelas orientações, devo muito a vocês | a **namorada** di, pelo amor e carinho, sem você tudo seria mais difícil | aos **meus tios** daniel e leonor rufino, sempre ajudando nos momentos em que mais precisei | à **agência de fomento** fapesp (proc. no. 2007/01859-4) pela concessão da bolsa e ao cnpq | ao **projeto biota** manguezais | à **orientadora** dra. siu mui tsai pelos ensinamentos, confiança e estímulo na realização da ciência | ao prof. josé chaud netto, que fez e ainda faz parte da minha formação | **aos professores** do cena e da esalq | ao **amigo** acácio pelo estímulo e companherismo e rodrigo taketani pelos ensinamentos | aos **colegas de trabalho** ademir, aline, amanda, caio, camila, carol, dani, daniel, diego, ézio, fabi, fernanda, lilian, lucélia, luciana, janaina, majú, mari, marquinhos e marcon, mateus, medau, monita e roberto, natália, othon, e muitos outros que ajudaram e fizeram parte | à **equipe técnica** do laboratório de biologia celular e molecular, josé elias gomes, Fábio Duarte, francisco e wagner picinini, pelo apoio | à secretária ludmila pelo bom humor e prontidão em ajudar | ao pessoal da **pós-graduação do cena**, alzira, cláudia, neuda e sônia | aos **amigos de moradia** elton, raphael e marcos | à todas as pessoas não citadas mas que completam a história

Lucas W. Mendes

"Aquele que mais profundamente estudar os mistérios da natureza mais plenamente se compenetrará de sua própria ignorância e fraqueza, compreenderá que existem profundidades e alturas que não poderá penetrar, vastos campos de verdades jazendo diante de si não penetradas. Dispor-se-á dizer como Newton: pareço-me como a criança na praia procurando seixos e conchas enquanto o grande oceano da verdade jaz por descobrir diante de mim."

(Ellen G. White | 1827 – 1915)

RESUMO

MENDES, L. W. Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso-SP. 2009. 141 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

Os manguezais tropicais são considerados um dos ecossistemas mais produtivos do mundo, sendo caracterizados pela alta taxa de ciclagem de matéria orgânica e nutrientes que ocorre entre os oceanos e os ambientes terrestres. Embora os manguezais sejam considerados áreas de proteção ambiental, a destruição desses ambientes é progressiva, devido a atividades industriais e portuárias nos estuários. Nos manguezais, a ciclagem de nutrientes está diretamente relacionada às atividades e a diversidade das comunidades microbianas presentes no solo. Este trabalho está inserido em um projeto mais amplo dentro do programa BIOTA/FAPESP, no que tange aos estudos da biodiversidade no Estado de São Paulo e utilização dessa biodiversidade de modo sustentável. O objetivo deste trabalho foi avaliar as estruturas e diversidade das comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* presentes no solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso-SP. As amostras foram analisadas pelas técnicas de T-RFLP, ARISA, clonagem e seqüenciamento a fim de obter uma caracterização das estruturas das comunidades microbianas de uma área de manguezal preservado em comparação com os ambientes adjacentes de restinga e floresta e também a um manguezal antropizado. Os resultados permitiram concluir que o manguezal possui características exclusivas, com a presença de organismos distintos, revelando um possível potencial biotecnológico a ser explorado. Adicionalmente, os dados revelaram que a ação antrópica afetou as estruturas dessas comunidades de modo a ser notada uma sensível diminuição de diversidade no manguezal antropizado, evidenciando, dessa maneira, a importância da preservação desse ecossistema.

Palavras-chave: Ecologia microbiana; Manguezal; T-RFLP; ARISA; rRNA

ABSTRACT

MENDES, L. W. Molecular analysis of the structures and diversity of microbial communities in soil of preserved mangroves of Ilha do Cardoso-SP. 2009. 141 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

The tropical mangroves are considered one of the most productive ecosystems of the world, being characterized by the high tax of organic matter and recycling of nutrients, that happens between the oceans and the terrestrial habitats. Although the mangroves are considered areas of environmental protection, the destruction of those ecosystems is progressive, due to industrial and port activities in the estuaries. In mangroves, the recycling of nutrients is directly related to the activities and to the diversity of microbial communities present in the soil. This work is part of a wider project inside of the program BIOTA/FAPESP, with respect to the studies of the biodiversity in the State of São Paulo and use of that biodiversity in a maintainable way. The objective of this work was to evaluate the structures and diversity of communities of *Bacteria*, *Archaea* and *Fungi* present in the soil of preserved mangrove of Ilha do Cardoso-SP. The samples were analyzed by T-RFLP and ARISA techniques, cloning and sequencing in order to obtain a characterization of the microbial communities structure of preserved mangrove area in comparison with the adjacent environments of restinga (tropical moist forest) and forest and also to a degraded mangrove. The results allowed concluding that the mangroves present exclusive characteristics, with the presence of distinct organisms, revealing a possible biotechnological potential to be explored. Additionally, the data revealed that the human action affected the structures of those communities in a way to be noticed a sensitive diversity decrease in the degraded mangrove, evidencing, this way, the importance of the ecosystem preservation.

Keywords: Microbial ecology; Mangrove; T-RFLP; ARISA; rRNA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Revisão da Literatura	18
1.1.1 O Ecossistema Manguezal e a Área de Estudo.....	18
1.1.2 Ecologia Microbiana	21
1.1.3 Técnicas Moleculares em Ecologia Microbiana	23
1.1.3.1 T-RFLP - Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism.....	23
1.1.3.2 ARISA - Automated Ribossomal Intergenic Spacer Analysis	26
1.1.3.3 Bibliotecas Genômicas	26
REFERÊNCIAS	29
2 ESTRUTURAS E DIVERSIDADE DE COMUNIDADES MICROBIANAS DO SOLO NO PERFIL MANGUEZAL-RESTINGA-FLORESTA.....	37
Resumo.....	37
Abstract	39
2.1 Introdução.....	41
2.2 Desenvolvimento	42
2.2.1 Material e Métodos.....	42
2.2.1.1 Área de Estudo.	43
2.2.1.2 Amostragem dos Solos	43
2.2.1.3 Extração de DNA Genômico do Solo	45
2.2.1.4 Amplificação do Gene 16S rRNA de <i>Bacteria</i>	46
2.2.1.5 Amplificação do Gene 16S rRNA de <i>Archaea</i>	47
2.2.1.6 Amplificação do Espaço Intergênico Ribossomal 18S-28S rRNA de <i>Fungi</i>	47
2.2.1.7 Purificação dos Produtos de PCR.....	48
2.2.1.8 Reação de Restrição dos Produtos de PCR para Análise de T-RFLP.....	48
2.2.1.9 Precipitação dos Produtos de Digestão.....	49
2.2.1.10 Análise do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) do gene 16S rRNA de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i>	49
2.2.1.11 Análise da Variabilidade do Espaço Intergênico Ribossomal (ARISA) 18S-28S de <i>Fungi</i>	50
2.2.1.12 Processamento dos Dados.....	50
2.2.2 Resultados e Discussão.....	52

2.2.2.1 Coleta e Caracterização dos Solos.....	52
2.2.2.2 Extração do DNA Genômico Total do Solo	54
2.2.2.3 Amplificação e Purificação dos Fragmentos de DNA	54
2.2.2.4 Análise dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i>	55
2.2.2.5 Análise da Variabilidade do Espaço Intergênico Ribossomal de <i>Fungi</i>	56
2.2.2.6 Resultados da Análise de T-RFLP de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> e ARISA de <i>Fungi</i> ..	56
2.2.2.7 Estruturas das Comunidades Microbianas no Perfil Manguezal-Restinga-Floresta.....	65
2.2.2.8 Relação das Comunidades Microbianas com os Atributos dos Solos.....	67
2.2.2.9 Análise de Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais.....	71
2.3 Conclusão	75
REFERÊNCIAS.....	77

3 ESTRUTURAS E DIVERSIDADE DE COMUNIDADES MICROBIANAS EM SOLO DE MANGUEZAL PRESERVADO E ANTROPIZADO	83
Resumo.....	83
Abstract	85
3.1 Introdução.....	87
3.2 Desenvolvimento	88
3.2.1 Material e Métodos.....	88
3.2.1.1 Área de Estudo	88
3.2.1.2 Amostragem dos Solos	89
3.2.1.3 Extração de DNA Genômico do Solo e Análise de T-RFLP e ARISA.....	91
3.2.1.4 Biblioteca 16S rRNA de <i>Archaea</i>	91
3.2.1.4.1 Amplificação do Gene 16S rRNA de <i>Archaea</i>	91
3.2.1.4.2 Purificação dos Produtos de PCR.....	92
3.2.1.4.3 Clonagem dos Produtos de PCR	92
3.2.1.4.4 Preparo das Células Competentes de <i>Escherichia coli</i>	93
3.2.1.4.5 Transformação de <i>E. coli</i>	93
3.2.1.4.6 Seleção dos Clones e Extração de DNA.....	94
3.2.1.4.7 PCR de Inseto e Purificação	94
3.2.1.4.8 PCR de Sequenciamento de Precipitação	95

3.2.1.4.9 Análise das Sequências	96
3.2.2 Resultados e Discussão.....	98
3.2.2.1 Coleta e Caracterização dos Solos	98
3.2.2.2 Extração do DNA Genômico Total do Solo.	99
3.2.2.3 Amplificação e Purificação dos Fragmentos de DNA	100
3.2.2.4 Análise dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i>	101
3.2.2.5 Análise da Variabilidade do Espaço Intergênico Ribossomal de <i>Fungi</i>	102
3.2.2.6 Resultados da Análise de T-RFLP de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> e ARISA de <i>Fungi</i> .	102
3.2.2.7 Estruturas das Comunidades Microbianas em Manguezal Preservado e Antropizado	108
3.2.2.8 Relação das Comunidades Microbianas com os Atributos dos Solos.....	111
3.2.2.9 Análise da Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais	114
3.2.2.10 Biblioteca Genômica do Gene 16S rRNA de <i>Archaea</i>	118
3.2.2.10.1 Amplificação e Purificação do Gene 16S rRNA de <i>Archaea</i>	118
3.2.2.10.2 Construção da Biblioteca 16S rRNA de <i>Archaea</i>	119
3.2.2.10.3 Sequenciamento Parcial dos Clones e Análise das Sequências	119
3.2.2.10.4 Análise da Diversidade das Comunidades de <i>Archaea</i>	120
3.2.2.10.5 Estimativa de Riqueza e Índices de Diversidades	126
3.3 Conclusão	131
REFERÊNCIAS	132

1 INTRODUÇÃO

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

(Leonardo da Vinci | 1452 – 1519)

Os ambientes de manguezais são reconhecidamente um dos ecossistemas mais produtivos do mundo, provendo uma grande quantidade de matéria orgânica para as águas costeiras adjacentes. Essa matéria orgânica serve como fonte de nutrientes, sendo a base de uma importante teia alimentar, na qual, organismos de importância econômica fazem parte. Adicionalmente, os manguezais servem como abrigo, fonte de alimento e berçário para crustáceos, moluscos, peixes de importância comercial, além de aves residentes e migratórias. A relação microrganismo-nutriente-plantas é um importante mecanismo de reciclagem e conservação de nutrientes nesse ecossistema.

O conhecimento das comunidades microbianas e sua relação com o ambiente consiste numa importante fonte de informação para o entendimento da dinâmica do ecossistema. Através de técnicas moleculares independentes de cultivo é possível acessar os principais membros que compõem a micro-fauna e traçar um perfil das estruturas dessas comunidades microbianas presentes no solo de manguezais.

Neste contexto, o principal objetivo desse trabalho foi caracterizar o perfil das comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* na sucessão manguezal-restinga-floresta num ambiente preservado; posteriormente, foi avaliado o efeito da ação antropogênica em manguezais sobre as comunidades microbianas, enfatizando, assim, a importância da preservação desses ambientes.

Dessa forma, com a finalidade de contextualizar o trabalho e os resultados obtidos, este capítulo introdutório apresenta uma revisão de literatura sobre o manguezal e a área de estudo, ecologia microbiana, e as técnicas moleculares utilizadas na pesquisa, como o T-RFLP, ARISA e bibliotecas genômicas.

1.1 Revisão de Literatura

1.1.1 O Ecossistema Manguezal e a Área de Estudo

Os manguezais tropicais são um dos ecossistemas mais produtivos do mundo, sendo caracterizados pela alta taxa de ciclagem de matéria orgânica e nutrientes que ocorre entre o oceano e os habitats terrestres (NEDWELL; BLACKURN; WIEBE, 1994). Os manguezais constituem um ecossistema complexo com alta interação entre plantas, animais e microrganismos, com características importantes, como o sedimento anaeróbico e altamente redutor (LYIMO et al., 2009). Em sedimentos marinhos anóxicos, a redução de sulfato e metanogênese são importantes processos de mineralização do carbono orgânico (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001; LYIMO; POL; OP DEN CAMP, 2002a, 2002b).

O manguezal é um ambiente único, dominado pela vegetação de mangue que possui desenvolvimento morfológico-biológico e adaptações ecofisiológicas especializadas para a sobrevivência neste ecossistema, o qual apresenta diversas condições extremas, como salinidades elevadas, influência das marés, ventos fortes, temperaturas altas, sedimentos lodosos e anaeróbios (FELLER; SITNIK, 1996; KATHIRESAN; BINGHAM, 2001). Os manguezais constituem um ecossistema de transição entre os ambientes terrestre, marinho e de água doce, sendo conhecidos e caracterizados como berçários e fonte de alimento para peixes e outros animais (GETTER et al., 1984).

O manguezal apresenta-se amplamente distribuído, cobrindo cerca de 60 a 75% da linha costeira mundial (HOLGUIN; BASHAN, 1996). O Brasil, a Indonésia e a Austrália são os países mais abundantes em ecossistemas de manguezal, sendo que cerca de 400.000 hectares são encontrados apenas na América Latina (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). No Brasil, os manguezais se entendem por cerca de 20.000 km², podendo ser encontrados desde o Cabo Orange, no Amapá, até o sul de Santa Catarina, na foz do Rio Araranguá, município de Laguna (CURY, 2002). No Estado de São Paulo, na região da baixada santista, formada pelos municípios de Bertioga, Cubatão, Guarujá, Itanhaém, Monganguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos e São Vicente encontra-se uma das maiores concentrações de manguezais do estado, apresentando uma área de cobertura vegetal de 675 Km², sendo que 125 Km² desta área correspondem a áreas típicas de mangue (GAMERO, 2001; CURY, 2002).

Dentre os principais fatores condicionantes da ocorrência, estrutura e funcionamento desses ecossistemas, podemos destacar: temperaturas tropicais, substratos aluviais, proteção contra ondas, presença de água salgada e considerável amplitude de marés (WALSH, 1974). 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 (WOODWELL et al., 1977; DELAUNE; PATRICK; BURESH, 1978). Partículas de origem terrígena e marinha, orgânica e inorgânica, estão em suspensão na água e se movimentam em função das correntes de fluxo sofrendo evaporação pela insolação e circulação do ar (MOGG, 1963). Geralmente os teores de oxigênio dissolvidos nas águas dos canais responsáveis pela inundação seguem um gradiente decrescente, desde a área próxima a baía até a parte superior do manguezal (TUNDISI et al., 1978).

A importância deste ecossistema reside na grande produtividade biológica com alta biodiversidade de peixes, crustáceos, moluscos, aves, répteis e mamíferos, sendo um dos ecossistemas mais produtivos de mundo. Apesar de constituírem Área de Preservação Permanente (Lei 4771 de 15 de setembro de 1965 do Código Florestal), têm sofrido as mais diversas ações antrópicas na sua exploração com finalidades econômicas, agrícolas, pesca predatória, e depósito de lixo, dentre outras. Do ponto de vista ecológico, sua importância consiste em manter a base alimentar da cadeia trófica, evitar a erosão do solo pelas marés, assim como reduzir o assoreamento dos portos e diminuir os impactos decorrentes da lixiviação de compostos químicos (EYSINK; POFFO, 2002).

Neste contexto, a Ilha do Cardoso foi escolhida como área de estudo. A ilha é localizada no município de Cananéia e foi determinada como Parque Estadual em 1962. Com área de 22.500 ha engloba grande variedade de ambientes associados à costa brasileira, como mata atlântica, restinga, duna, manguezal, estuário, praia e costão rochoso (MENEZES; SCHAEFFER-NOVELLI, 1994), os quais têm sido foco de estudo para muitos pesquisadores, procurando uma melhor compreensão do papel destes ambientes na manutenção do equilíbrio na região.

O Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC) (<http://www.cananet.com.br/peic/>), administrado pelo Instituto Florestal da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, localiza-se no litoral sul do estado, na divisa com o estado do Paraná, abrangendo uma área aproximada de 151 Km², situando-se entre as coordenadas 48°05'42" W, 25°03'05" S e 48°53'48" W, 25°18'18" S, separado do continente pelo canal de Trapandé. A localização e

vias de acesso ao Parque têm como referência os municípios de Cananéia e de Ilha Comprida (Figura 1.1).

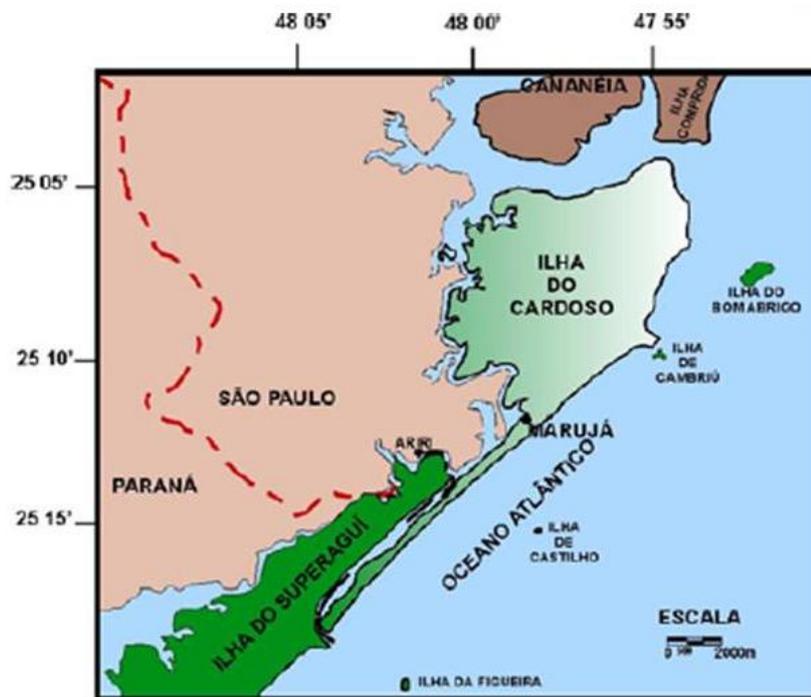


Figura 1.1 - Localização do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (BERNARDI, 2005, modificado de WEBER, 1998).

A topografia da Ilha é predominantemente montanhosa, com a parte central dominada por elevações acima de 814 m. Os tipos de vegetação existentes na Ilha encontram-se em um franco estado de sucessão ecológica, com vários mosaicos desde a planície costeira até a região serrana. O gradiente de vegetação encontrado está relacionado com os diferentes tipos de substratos, com limites dos tipos de vegetação coincidentes, indicando uma dependência pedológica espacial (BERNARDI et al., 2005).

Na adjacência dos manguezais da Ilha do Cardoso, são encontradas outras formações inseridas na mesma paisagem, sendo elas a restinga e a floresta pluvial tropical. A restinga ocupa uma região de depósitos arenosos relativamente recentes, e que recebem a influência fluvial e marinha. Os solos arenosos ou pantanosos são ácidos e de baixa fertilidade, caracterizados pela movimentação e pelas flutuações sazonais do lençol freático (SUGIYAMA; MANTOVANI, 1993). A floresta pluvial tropical tem seu posicionamento ligado ao relevo, à umidade e à pluviosidade. Diferenças na composição das espécies e na estrutura florestal são relacionadas à altitude, as quais são atribuídas a um gradiente climático,

envolvendo fatores como temperatura, precipitação, umidade atmosférica, radiação solar e frequência de geadas (LEITÃO-FILHO, 1982), ou variações no substrato relacionadas à profundidade e fertilidade do solo (MEIRA NETO et al., 1989; LEITÃO-FILHO et al., 1993).

Nesse complexo ecossistema, as comunidades de microrganismos desempenham papel importante na transformação dos nutrientes (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). O conhecimento dessas comunidades microbianas é uma importante ferramenta para entender a dinâmica desse ambiente, como também seu potencial biotecnológico, destacando a importância da preservação e manutenção dessas áreas.

1.1.2 Ecologia Microbiana

Os microrganismos representam uma porção significativa dos organismos presentes no solo, principalmente por causa de sua abundância, diversidade e múltiplas atividades metabólicas (TORSVIK; GOKSOYR; DAAE, 1990; OVREAS, 2000; KIRK et al., 2004). É essencial entender as inter-relações entre os microrganismos e o ambiente através do estudo das estruturas e da diversidade funcional das comunidades microbianas no solo e como elas respondem a distúrbios naturais ou antropogênicos (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000).

Durante muito tempo a diversidade das comunidades de microrganismos foi investigada por meio de técnicas baseadas no cultivo e isolamento, as quais são conhecidamente seletivas, não abrangendo de forma representativa grande parte da comunidade microbiana em solos. Recentes avanços no campo da ecologia molecular microbiana, incluindo extração de DNA, reação de polimerase em cadeia – PCR, clonagem e seqüenciamento, têm possibilitado o desenvolvimento de técnicas não dependentes de cultivo, o que reduz os problemas associados às técnicas convencionais. Novas técnicas de biologia molecular têm revelado uma grande diversidade microbiana que não era detectada previamente com as técnicas dependente de cultivo e identificação morfológica (HUGHES et al., 2001). Adicionalmente, essas novas ferramentas têm permitido o desenvolvimento de pesquisas com menor custo e tempo, e com maior capacidade de produção de dados (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000; ARMOUGOM; RAOULT, 2009).

Neste cenário, a ecologia microbiana vem sofrendo profundas mudanças com o acúmulo de informações biológicas e de parâmetros ambientais (RAMETTE, 2007).

Estima-se que o número total de células procarióticas no solo seja de 1,5 a 6,6 x10³⁰ (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998), mas a real dimensão dessa diversidade é ainda desconhecida. Sabe-se que as comunidades microbianas desempenham papel fundamental nos processos biogeoquímicos do solo, constituindo organismos chave para o funcionamento da ciclagem de nutrientes, desta forma, podendo ter um papel importante na manutenção da qualidade dos solos (LAMBASIS et al., 2005).

Os microrganismos encontrados em manguezais possuem papel fundamental nas transformações bioquímicas de nutrientes e são essenciais para degradação da matéria orgânica (NUNES, 2006). Muitos estudos, envolvendo a diversidade de microrganismos e sua importância em solos, vêm sendo realizados (TORSVIK; GOKSOYR; DAAE, 1990; BLACKWOOD et al., 2003; FIERER; JACKSON, 2006; THIES, 2007), porém sua presença e função em solos de manguezais ainda é pouco conhecida. Além disso, a descrição e a distribuição da diversidade microbiana nesses ambientes nos permite um maior entendimento das interações desses organismos com o ecossistema manguezal.

Em solos de manguezais tropicais, bactérias e fungos constituem 91% da biomassa microbiana total (ALONGI, 1988; BANO et al., 1997). Muitos trabalhos recentes em ecologia microbiana têm o foco direcionado em conhecer a diversidade de bactérias em solos e como essas comunidades são afetadas por distúrbios e mudanças ambientais específicas (FIERER; JACKSON, 2006). Cury (2006) mostrou que membros do domínio *Bacteria* estão presentes em abundância em solos de manguezal e que possivelmente possam desempenhar papel importante nas atividades de decomposição, transformação de nutrientes e outros processos biogeoquímicos relacionados à manutenção da capacidade produtiva dos solos destes ambientes.

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 *Archaea* 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., 2008).

Neste contexto, a análise da diversidade microbiana é importante para aumentar o conhecimento dos recursos genéticos em uma comunidade, entender padrões da distribuição relativa dos microrganismos, aumentar o conhecimento do papel funcional da diversidade,

identificar diferenças na diversidade associada a distúrbios no manejo, entender a regulação da biodiversidade, e entender até que ponto o funcionamento e a sustentabilidade do ecossistema depende da manutenção no nível específico da diversidade (OVREAS, 2000).

1.1.3 Técnicas Moleculares em Ecologia Microbiana

1.1.3.1 T-RFLP - Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

Os avanços nas técnicas moleculares, aplicados ao estudo da ecologia de microrganismos em sistemas complexos têm contribuído significativamente para o entendimento das comunidades microbianas do solo, inclusive de microrganismos não cultiváveis (ROSADO et al., 1997; HANDELSMAN; SMALLA, 2003). Métodos baseados na amplificação de ácidos nucléicos por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), como a análise de T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*), permitem aos pesquisadores comparar diferentes comunidades de microrganismos derivados de diferentes ambientes (MARSH, 1999). Esses métodos precisam ser rápidos, reprodutíveis, econômicos e de fácil manipulação (THIES, 2007).

O T-RFLP ganhou popularidade nos últimos anos devido à alta reprodutibilidade e o acesso a um grande número de unidades taxonômicas operacionais (UTO's) (OSBORN; MOORE; TIMMIS, 2000). Esta técnica já foi empregada para caracterizar as comunidades microbianas em diferentes ambientes, como solos de floresta, solos poluídos, sedimentos, estruturas de plantas, trato digestivo de minhocas, entre outros (THIES, 2007).

Como seu nome sugere, a análise de T-RFLP determina o polimorfismo no comprimento dos fragmentos terminais de uma reação de restrição, provenientes de um produto de amplificação de PCR, sendo um dos *primers* marcado com fluorescência. É um método muito sensível a mudanças nas estruturas de comunidades microbianas do solo, além de possuir alta capacidade de processamento disponível, permitindo a análise de uma grande quantidade de amostras (LIU et al., 1997; TIEDJE et al., 1999).

A análise de T-RFLP utiliza métodos rápidos de extração de DNA de comunidades de microrganismos de amostras ambientais, amplificação do gene *rrs* (gene que codifica para o 16S rRNA), reação de restrição, e análise dos fragmentos terminais de restrição (T-RFs) em

seqüenciador automatizado. A técnica pode ser usada como um screening rápido de algum gene para buscar diferenças entre comunidades em amostras ambientais. Os fragmentos de restrição terminal resultantes são medidos e comparados entre as amostras, podendo ser usados para matrizes de similaridade e análise de componentes principais.

Os passos iniciais da técnica de T-RFLP incluem a extração de DNA da comunidade que se deseja analisar, seguido pela amplificação por PCR do gene 16S rRNA do DNA da comunidade utilizando *primers* específicos do domínio ou grupo, constituídos com o auxílio de 3000 a 5000 seqüências de bases de dados (TIEDJE et al., 1999). Os *primers* utilizados são marcados com fluoróforo que pode ser detectado por um seqüenciador automático ABI. Uma vez que o marcador está na extremidade 5' terminal, somente o fragmento terminal da digestão de restrição é detectado, e seu tamanho determinado pelo seqüenciador automático. Alguns diferentes fluoróforos têm sido utilizados com sucesso na análise, incluindo HEX, FAM e ROX (THIES, 2007). Após a amplificação por PCR o produto é purificado e, em reações individuais, digerido com 2-4 enzimas de restrição. As enzimas que proporcionam a máxima resolução, baseado nas análises de restrição de base de dados, bem como em comunidades naturais, são *HhaI*, *RsaI*, e *MspI*, mas outras podem utilizadas em circunstâncias especiais (MARSH et al., 2000). Os produtos da digestão são carregados em um seqüenciador ABI e a corrida é realizada em um modo de varredura com tamanho interno padrão incluído em cada linha de leitura (LIU et al., 1997).

Os tamanhos dos T-RFs marcados com o fluoróforo são convertidos em um eletroferograma, onde cada pico representa um T-RF. O processamento dos dados se dá pela conversão dos eletroferogramas em uma matriz, cada coluna representando uma amostra e cada linha representando uma T-RF que é encontrada em uma amostra. As opções de software incluem o GeneScanTM ou Gene MapperTM (ABI) e PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems) ou um software tal como GelComparII (Applied-Maths), que pode importar dados não processados de arquivos de eletroferogramas. Estes programas calculam o tamanho do fragmento de restrição terminal bem como a intensidade de fluorescência (altura ou área do pico). O comprimento do fragmento de restrição pode ser determinado pela base de dados ribossomais completa e, conseqüentemente, proporcionar um ponto de partida filogenético lógico. Um esquema completo da análise por T-RFLP é apresentado na Figura 1.2.

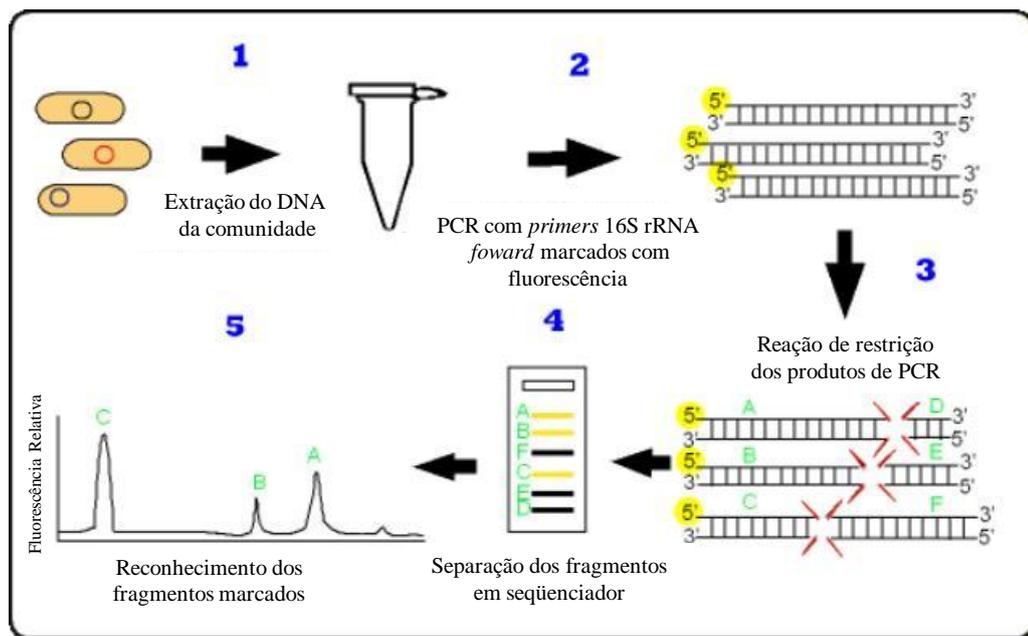


Figura 1.2 - 1) O DNA é extraído da amostra de interesse; 2) O gene de interesse é amplificado usando a técnica de PCR com um *primer* marcado com fluorescência; 3) Produtos de PCR de tamanho igual ou similar marcados com fluorescência na extremidade final. Após a purificação, os produtos de PCR são digeridos com enzimas de restrição, que geram fragmentos de diferentes tamanhos. 4) Estes fragmentos são separados em gel de eletroforese ou capilaridade. 5) Um leitor a laser detecta os fragmentos marcados e gera um perfil baseado no comprimento dos fragmentos. (Modificado de Grüntzig et al., 2002).

Experimentalmente, o comprimento dos fragmentos de restrição pode ser determinado abaixo de 1,5 bases, representando uma alta sensibilidade da técnica. Além disso, por medir o fragmento de restrição terminal de cada gene 16S rRNA, a complexidade do padrão de RFLP é reduzida e cada banda visível (fragmento) é representativo de um único ribotipo ou unidade taxonômica operacional (UTO). Assim, em seguida, proporciona uma base quantitativa para a estimativa da diversidade que, ainda que imperfeita, é mais sensível para medições que outros métodos (LIU et al., 1997; TIEDJE et al., 1999).

Apesar de algumas limitações, a análise de T-RFLP ainda é altamente discriminatória, sendo utilizada com sucesso para a caracterização de comunidades microbianas provenientes de uma ampla variedade de ambientes. Qualquer gene para os quais *primers* possam ser desenhados pode ser analisado por meio deste método. O número de publicações as quais o uso do T-RFLP tem sido usado para caracterizar comunidades microbianas continua crescendo, pois a técnica é robusta, altamente reprodutível, e rende um grande número de UTO's.

1.1.3.2 ARISA – Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

Dentre as técnicas moleculares utilizadas para a caracterização de comunidades microbianas, uma técnica simples e segura é a análise do espaço intergênico (RISA – rRNA Intergenic Spacer Analysis), a qual explora a variabilidade do comprimento do espaço intergênico entre subunidades do gene rRNA no operon *rrn*. Uma metodologia automatizada, denominada ARISA, foi desenvolvida para aperfeiçoar a resolução e a análise dos dados, propiciando resultados mais robustos (FISCHER; TRIPLETT, 1999; RANJARD et al., 2001).

ARISA e T-RFLP são técnicas similares, baseadas na marcação terminal de um fragmento de amplificação utilizando *primers* marcados com fluorescência, sendo então analisados diretamente em um seqüenciador automático para determinar o tamanho do fragmento em pares de bases (RANJARD et al., 2001).

No T-RFLP, os fragmentos amplificados são primeiramente submetidos a uma reação de restrição e então somente o fragmento terminal é analisado no seqüenciador, etapa que não é necessária no ARISA, pois a região amplificada nesta técnica já apresenta polimorfismos no seu comprimento (KLAMER, 2002). A análise de ARISA é baseada na amplificação da região intergênica entre 16S e 23S para bactérias e na região do DNA ribossomal que contém os dois espaços intergênicos transcritos (ITS) e o gene 5,8S rRNA (ITS1-5,8S-ITS2) no caso de fungos, regiões que são caracterizadas por uma significativa variabilidade no comprimento e seqüência de nucleotídeos entre diferentes genótipos microbianos (DAFFONCHIO et al., 2003; DANOVARO et al., 2006).

A técnica de ARISA permite uma rápida investigação da estrutura de comunidades microbianas mesmo quando há um grande número de amostras disponíveis. Devido à alta resolução e sensibilidade da técnica, o número de UTO's é maior do que a técnica de RISA, o que permite uma robusta comparação entre perfis de comunidades.

1.1.3.3 Bibliotecas Genômicas

A abordagem mais utilizada para o estudo de comunidades microbianas em amostras ambientais é a amplificação, clonagem e seqüenciamento de genes presentes nos organismos da comunidade, os quais são utilizados para a sua identificação (JESUS, 2008). Desta forma,

as bibliotecas genômicas consistem em coleções de seqüências de DNA, construídas considerando-se material genético de qualquer organismo, bem como em seqüências obtidas de amostras ambientais (TINGRE; RUBIN, 2005).

O gene 16S rRNA se tornou a região alvo mais utilizada para estudos de filogenia, fornecendo uma visão geral da composição da comunidade. Os genes rRNAs são universalmente distribuídos nos diferentes grupos de seres vivos, sendo a molécula que apresenta o maior grau de conservação existente. Sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão em diferentes regiões da molécula (LANE et al., 1985). O gene 16S rRNA é um fragmento de aproximadamente 1500 nucleotídeos, presente em todos os seres vivos e gera grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas (AMANN; LUDWING, 2000). A vantagem da utilização desse gene consiste na disponibilidade de um grande número de seqüências em bancos de dados, como GenBank, Ribossomal Data Base Project (RDP), European Molecular Biology Laboratory (EMBL), GreenGenes acessíveis gratuitamente, permitindo a comparação de novas seqüências obtidas com as seqüências depositadas nesses bancos (COUTINHO et al., 1999).

Brevemente, o processo de construção de bibliotecas genômicas consiste na extração do DNA/RNA dos organismos da comunidade; as seqüências de interesse são amplificadas por PCR ou transcriptase reversa (para o caso de RNA); os fragmentos amplificados são clonados em vetores, geralmente plasmídeos; os plasmídeos são inseridos em células competentes de *Escherichia coli*, onde são multiplicados; o vetor é extraído das células e o fragmento clonado é seqüenciado. O seqüenciamento realizado nas diferentes cópias do gene obtidas por PCR e sua comparação com bases de dados fornecem informação sobre a diversidade filogenética dos organismos presentes no material estudado (JESUS, 2008).

As seqüências de 16S rRNA geradas a partir do seqüenciamento podem ser comparadas com os bancos de dados públicos. Os bancos de dados do GenBank e o RDP permitem a determinação do organismo com seqüência mais similar e suas possíveis funções no solo, como também são úteis para o cálculo de índices de diversidade, estimadores de riqueza de espécies, dentre outras metodologias de análise de bibliotecas genômicas (BENSON et al., 2005; COLE et al, 2007; CURY, 2006). Atualmente, existem vários softwares elaborados para a análise de bibliotecas genômicas, incluindo DOTUR, S-Libshuff, FastGroupII, TreeClimber, SONS e o Unifrac (SINGLETON et al., 2001; SCHLOSS; LARGETE; HANDELSMAN, 2004; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005; SCHLOSS; HANDELSMAN,

2006a, 2006b; LOZUPONE; HAMADY; KNIGHT, 2006), os quais se aplicam a diversas abordagens para comparação entre bibliotecas e cálculos de índices de diversidade.

Os dados gerados a partir da clonagem do gene 16S rRNA têm possibilitado a caracterização das estruturas das comunidades microbianas presentes em amostras ambientais, como também a identificação de espécies predominantes, que podem ser utilizadas como indicadoras de qualidade do solo (CANNAVAN, 2007).

Estudos recentes têm confirmado que esta forma de análise é uma fonte vasta de recursos para a prospecção de novos produtos biotecnológicos (COURTOIS et al., 2003) e, combinados com técnicas mais rápidas e menos onerosas, como *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) e T-RFLP, fornecem informações consistentes da composição das comunidades microbianas nos ambientes.

REFERÊNCIAS

- ALONGI, D.M. Bacterial productivity and microbial biomasses tropical mangrove sediments. **Microbial Ecology**, New York, v. 15, p. 59-79, 1988.
- AMANN, R.I.; LUDWING, W. Ribosomal RNA-Targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **Microbiology Reviews**, New York, v. 24, p. 555-565, 2000.
- ARMOUGOM, F.; RAOULT, D. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. **Journal of Computer Science & Systems Biology**, v. 2, p. 69-92, 2009.
- BANO, N.; NISA, M.U.; KHAN, N.; SALEEM, M.; HARRISON, P.J.; AHMED, S.I.; AZAM, F. Significance of bacteria in the flux of organic matter in the tidal creeks of the mangrove ecosystem of the Indusriver delta, Pakistan. **Marine Ecology Progress Service**, v. 157, p. 1-12, 1997.
- BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; WHEELER, D.L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 34-38, 2005.
- BERNARDI, J.V.E.; LANDIM, P.M.B.; BARRETO, C.L.; MONTEIRO, R.C. Spatial study of the vegetation gradient from Cardoso Island State Park, SP, Brazil. **Holos Environment**, Rio Claro, v. 5, n. 1, p. 1-22, 2005.
- BLACKWOOD, C.B.; MARSH, T.; KIM, S.; PAUL, E.A. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 2, 2003.
- BUCKLEY, D.H.; GRABER, J.R.; SCHMIDT, T.M. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom *Crenarcheota* and their diversity and abundance in soil. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4333-4339, 1998.
- CADILLO-QUIROZ, H.; YASHIRO, E.; YAVITT, J.B.; ZINDER, S.H. Characterization of the Archaeal Community in a Minerotrophic Fen and Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism-Directed Isolation of a Novel Hydrogenotrophic Methanogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 2059-2068, 2008.
- CANNAVAN, F.S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; BANDELA, A.M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.

The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, p. 169-172, 2007.

COURTOIS, S.; CAPPELLANO, C.M.; BALL, M.; FRANCOU, F.X.; NORMAND, P.; HELYNCK, G.; MARTINEZ, A.; KOLVEK, S.J.; HOPKE, J.; OSBURNE, M.S.; AUGUST, P.R.; GUERINEAU, M.; JEANNIN, P.; SIMONET, P.; PERNODET, J.L. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 49-55, 2003.

COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M. de; MANFIO, G.P; ROSADO, A.S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 71, n. 3, p. 491-503, 1999.

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

CURY, J.C. **Diversidade de *Bacteria* e *Archaea* em solos de mangue e marisma**. 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

DAFFONCHIO, D.; CHERIF, A.; BRUSETTI, L.; RIZZI, A.; MORA, D.; BOUDABOUS, A.; BORIN, S. Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 5128-5137, 2003.

DANOVARO, R.; LUNA, G.M.; DELL’ANNO, A.; PIETRANGELI, B. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 5982-5989, 2006.

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.

EYSINK, G.G.J.; POFFO, I.R.F. Recuperação de manguezais – Proposta pedagógica para programas de educação ambiental. In: HAMMER, V. S. **Educação ambiental para o desenvolvimento sustentável**. Brasília: Embrapa Informática e Tecnologia, 2002. v. 5, 130 p.

FELLER, I.C.; SITNIK, M. **Mangrove ecology**. A manual for a field course. Washington: Smithsonian Institution, 1996. 129 p.

FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 103, n. 3, p.626-631, 2006.

FISCHER, M.M.; TRIPLET, E. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 4630-4636, 1999.

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.

GAMERO, R.M.P. **Mineralogia, físico-química e classificação dos solos de mangue do rio Iriri no canal de Bertioiga (Santos, SP)**. 2001. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

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. cap. 3, p. 65-113.

GRÜNTZIG, V.; STRES, B.; AYALA DEL RÍO, H.L.; TIEDJE, J. M. **Improved protocol for T-RFLP by capillary electrophoresis**. East Lansing: Ribosomal Database Project, Michigan State University, 2002. Disponível em: http://rdp.cme.msu.edu/html/t-rflp_jul02.html. Acesso em: 15 jul. 2007.

HANDELSMAN, J.; SMALLA, K. Conversations with the silent majority. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, p. 271-273, 2003.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems; an overview. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 33, p. 265-278, 2001.

HOLGUIN, G.; BASHAN, Y. Nitrogen-fixation by *azospirillum brasilense* cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*staphylococcus* sp.). **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 1651-1660, 1996.

HUGHES, J.B.; HELLMANN, J.J.; RICKETTS, T.H.; BOHANNAN, B.J.M. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4399-4406, 2001.

JESUS, E.C. **Bacterial diversity in soils from different land use systems of the western Brazilian Amazon**. 2008. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

KATHIRESAN, K.; BINGHAN, B.L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, San Diego, v. 40, p. 81-251, 2001.

KIRK, J.E.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, p. 169-188, 2004.

KLAMER, M.; ROBERTS, M.S.; LEVINE, L.H.; DRAKE, B.G.; GARLAND, J.L. Influence of elevated CO₂ on the fungal community in a coastal scrub oak forest soil investigated with terminal restriction fragment polymorphism analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4370-4376, 2002.

KOTSYURBENKO, O.R.; CHIN, K.; GLAGOLER, 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: SBCS, 2005. v. 4, p. 43-84.

LANE, D.J.; STAHL, D.A.; OLSEN, G.J.; HELLER, D.J.; PACE, N.R. Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 163, p. 75-81, 1985.

LEITÃO-FILHO, H.F.; PAGANO, S.N.; CESAR, O.; TIMONI, J.L.; RUEDA, J.J. **Ecologia da Mata Atlântica em Cubatão**. Campinas: Editora da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 1993.

LEITÃO-FILHO, H.F. Aspectos taxonômicos das florestas do estado de São Paulo. **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v. 16A, p. 197-206, 1982.

LIU, W.T.; MARSH, T.L.; CHENG, H.; FORNEY, L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4516-4522, 1997.

LOZUPONE, C.; HAMADY, M.; KNIGHT, R. UniFrac – An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. **BMC Bioinformatics**, London, v. 7, p. 371, 2006.

LYIMO, T.J.; POL, A.; OP DEN CAMP, H.J.M. Methane emission, sulphide concentration and redox potential profiles in Mtoni mangrove sediment, Tanzania. **Western Indian Ocean Journal Marine Science**, Zanzibar, v. 1, p. 71-80, 2002a.

LYIMO, T.J.; POL, A.; OP DEN CAMP, H.J.M. Sulfate reduction and methanogenesis in sediments of Mtoni mangrove forest, Tanzania. **Ambio**, Stockholm, v. 31, p. 614-616, 2002b.

LYIMO, T.J.; POL, A.; JETTEN, M.S.M.; OP DEN CAMP, H.J.M. Diversity of methanogenic Archaea in a mangrove sediment and isolation of a new *Methanococoides* strain. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 291, p. 247-253, 2009.

MARSH, T.L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplifications products. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, p. 323-327, 1999.

MARSH, T.L.; SAXMAN, P.; COLE, J.; TIEDJE, J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3616-3620, 2000.

MEIRA-NETO, J.A.A.; BERNACCI, L.C.; GROMBONE, M.T.; TAMASHIRO, J.Y.; LEITÃO-FILHO, H.F. Composição florística da floresta semidecídua de altitude do Parque Municipal da Grota Funda (Atibaia, Estado de São Paulo). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 3, p.51-74, 1989.

MENEZES, G.V.; SHAEFFER-NOVELLI, Y. **Produção e decomposição em bosques de mangue na Ilha do Cardoso, Cananéia, SP**. 1994. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ecossistemas de Mangue) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

MOGG, A.O.D. A preliminary investigation of the significance of salinity in zonation of species in salt marsh and mangrove swamp associations. **South African Journal Science**, Lynnwood Ridge, v. 59, n. 3, p. 81-86, 1963.

NEDWELL, D.B.; BLACKURN, T.H.; WIEBE, W.J. Dynamic nature of turnover of organic carbon, nitrogen and sulphur in the sediments of a Jamaican mangrove forest. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf/Luhe, v. 110, p. 203-212, 1994.

NUNES, G.L. **Diversidade e estrutura de comunidades de Bacteria e Archaea em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

OSBORN, A.M.; MOORE, E.R.B.; TIMMIS, K.N. An evaluation on terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 39-50, 2000.

OVREAS, L. Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters**, Malden, v. 3, 236-251, 2000.

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, p. 142-160, 2007.

RANJARD, L.; POLY, F.; LATA, J.C.; MOUGUEL, C.; THIOLOUSE, J.; NAZARET, S. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4479-4487, 2001.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 167-177, 2000.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 135-147, 1997.

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

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing TreeClimber, a test to compare microbial community structures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 2379-2384, 2006a.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 6773-6779, 2006b.

SCHLOSS, P.D.; LARGETE, B.R.; HANDELSMAN, J. Integration of Microbial Ecology and Statistics: a Test to Compare Gene Libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 5485-5492, 2004.

SINGLETON, D.R.; FURLONG, M.A.; RATHBUN, S.T.; 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.

SUGIYAMA, M.; MANTOVANI, W. Fitossociologia de um trecho de mata de restinga na Ilha do Cardoso, SP. In: SIMPÓSIO DE ECOSSISTEMAS DA COSTA BRASILEIRA, 3., 1993, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ACIESP, 1993. p. 49-66.

THIES, J.E. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 71, p. 579-591, 2007.

TIEDJE, J.M.; ASUMING-BREMPPONG, S.; NUSSLEIN, K.; MARSH, T.L.; FLYNN, S.J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, p. 109-122, 1999.

TINGRE, S.G.; RUBIN, E.M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 6, p. 805-814, 2005.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 3, p. 782-787, 1990.

TUNDISI, J.; TEIXEIRA, C.; TUNDISI, T.M.; KURNER, M.B.; KINOSHITA, L. Plankton studies in a mangrove environment. IX. Comparative investigations with coastal oligotrophic water. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 38, n. 2, p. 301-320, 1978.

WALSH, G.E. Mangroves: a review. In: REINOLD, R.J.; QUEEN, W.H. (Ed.). **Ecology of halophytes**. New York: Academic Press, 1944. p. 51-154.

WEBER, W. **Geologia e geocronologia da Ilha do Cardoso, sudoeste do Estado de São Paulo**. 1998. 87 f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica e Geotectônica) - Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

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

WOODWELL, G. M.; WHITNEY, D. E.; HALL, C.A.S.; HOUGHTON, R.A. The flax pond ecosystem study: Ex changes of carbon in water between a salt marsh an long island sound. **Limnology and Oceanography**, Grafton, v. 22, n. 5, p. 833-938, 1977.

2 ESTRUTURAS E DIVERSIDADE DE COMUNIDADES MICROBIANAS DO SOLO NO PERFIL MANGUEZAL-RESTINGA-FLORESTA

Resumo

Os manguezais desempenham um papel fundamental no ecossistema, possuindo características exclusivas que os tornam diferentes dos ambientes adjacentes. O estudo comparativo das comunidades microbianas de solo de manguezal, restinga e floresta é inédito. As estruturas e diversidade das comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* presentes no solo no perfil manguezal-restinga-floresta foram acessadas por meio das técnicas de T-RFLP e ARISA, e os resultados indicaram mudanças estruturais na composição dessas comunidades em função do ambiente estudado, agrupando as amostras de acordo com a sucessão observada no ambiente natural. As estruturas das comunidades microbianas se correlacionaram com as propriedades físico-químicas dos solos estudados e o pH foi o atributo que melhor se relacionou com a variação dos dados. De maneira geral, as comunidades de *Bacteria* e *Fungi* apresentaram maior riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais em comparação com as comunidades de *Archaea*; A riqueza de *Bacteria* e *Fungi* foi maior nos primeiros 20 cm dos solos estudados enquanto a riqueza de *Archaea* foi maior nas camadas mais profundas amostradas. O manguezal apresentou dados relevantes de riqueza, com a presença de organismos exclusivos. Os resultados visaram contribuir com o conhecimento da diversidade de microrganismos de solo de manguezal, em comparação com os ambientes de restinga e floresta, de forma a relevar a importância da preservação dessas áreas e seu possível potencial biotecnológico, por apresentar diversidade e características exclusivas para esses ecossistemas.

Palavras-chave: Ecologia microbiana; Manguezal; Restinga; Floresta; T-RFLP; ARISA

STRUCTURE AND DIVERSITY OF SOIL MICROBIAL COMMUNITIES IN THE PROFILE MANGROVE-RESTINGA-FOREST

Abstract

The mangroves play an important role in the ecosystem, with exclusive characteristics that become them different from the adjacent environments. The comparative study of microbial communities of soil of mangroves, restinga (tropical moist forest) and forest is unpublished. The structures and diversity of *Bacteria*, *Archaea* and *Fungi* communities presents in the soil in the profile mangroves-restinga-forest were accessed through the T-RFLP and ARISA techniques, and the results showed structural changes in those communities composition in function of the environment studied, grouping the samples in agreement with the succession observed in the natural environment. The microbial communities' structures were correlated with the physiochemical properties of the studied soils and the pH was the attribute that better linked with the data variation. In general, the communities of *Bacteria* and *Fungi* presented larger richness of Operational Taxonomic Units in comparison with the communities of *Archaea*; the richness of *Bacteria* and *Fungi* was larger in the first 20 cm of the studied soils while the richness of *Archaea* was larger in the lower layers of soil. The mangroves presented relevant data of richness, with the presence of exclusive organisms. The results sought to contribute with the knowledge about the diversity of microorganisms in mangroves soil, in comparison with the restinga and forest, in way to emphasize the importance of the preservation of those areas and its possible biotechnological potential, for presenting diversity and exclusive characteristics for those ecosystems.

Keywords: Microbial ecology; Mangroves; Restinga; Forest; T-RFLP; ARISA

2.1 Introdução

"A mais profunda emoção que podemos experimentar é inspirada pelo senso do mistério. Essa é a emoção fundamental que inspira a verdadeira arte e a verdadeira ciência".

(**Albert Einstein** | 1879 – 1955)

O Parque Estadual da Ilha do Cardoso é formado por diversos tipos de vegetação, as quais se encontram em um franco estado de sucessão ecológica com vários mosaicos, desde a planície costeira até a região serrana (BERNARDI et al., 2005). Dentre os diversos tipos de vegetação presentes na Ilha, encontramos os ambientes de manguezais, florestas e restingas. Muitas dessas áreas apresentam um elevado grau de preservação, sendo encontrados praticamente em sua forma natural.

O manguezal desempenha um importante papel dentro de um ecossistema maior, protegendo a linha costeira de erosão, danos por tempestades e ação do mar (YAN; HONG; YU, 2006). Os manguezais também ajudam no tratamento de efluentes, provêm áreas de acasalamento e crescimento de diversas espécies, funcionam como refúgio e zonas de alimentação para organismos marinhos, e fornecem uma grande quantidade de matéria orgânica para as águas costeiras adjacentes (RONNBACK, 1999).

As comunidades de microrganismos habitantes desses ambientes desempenham papel importante na transformação dos nutrientes (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). O conhecimento dessas comunidades microbianas se tornou uma importante ferramenta para avaliar a qualidade dos solos, através do estudo das estruturas e da diversidade dessas comunidades.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo conhecer as estruturas das comunidades microbianas presentes nos solos de manguezal, procurando entender a sua importância na manutenção desse ecossistema. Neste estudo, foi realizado um levantamento das comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* do solo de um manguezal preservado e nos ambientes adjacentes de floresta e restinga, presentes na Ilha do Cardoso. Com a finalidade de correlacionar a diversidade dessas comunidades no manguezal em relação aos ambientes adjacentes, as estruturas das comunidades microbianas foram determinadas no perfil

manguezal-restinga-floresta, por meio das técnicas de T-RFLP e ARISA, destacando, assim, a importância da preservação ambiental dos manguezais.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, CENA/USP, Piracicaba-SP. Uma representação explicativa das etapas do trabalho pode ser visualizada na Figura 2.1.

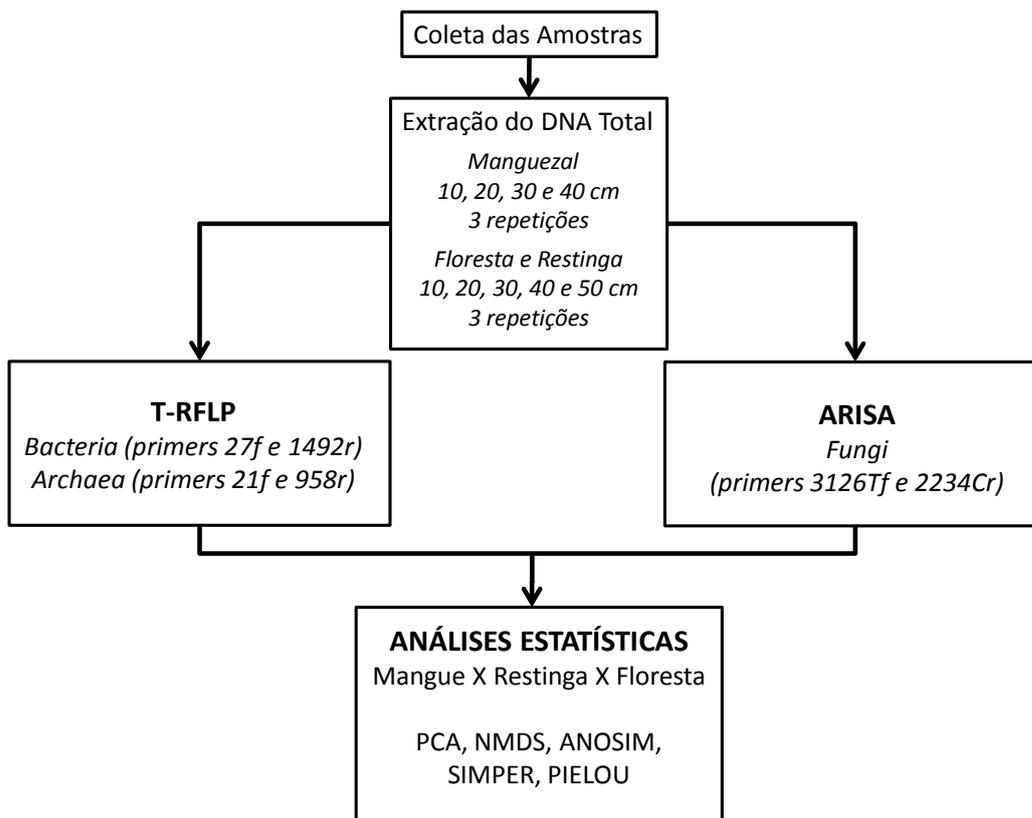


Figura 2.1 – Diagrama explicativo das etapas realizadas no trabalho.

2.2.1.1 Área de Estudo

Amostras de solo de mangue, floresta e restinga foram coletadas no Parque Estadual da Ilha do Cardoso, situado no sul do litoral do Estado de São Paulo no município de Cananéia, entre os paralelos $25^{\circ}03'05''$ - $25^{\circ}18'18''$ e os meridianos $47^{\circ}53'48''$ - $48^{\circ}05'42''$ (Figura 2.2). A Ilha faz parte do complexo estuarino lagunar de Iguape-Cananéia-Paranaguá, com uma área de aproximadamente 22.500 ha, transformada em Parque Estadual pelo Decreto 40.319 de 1962 (NEGREIROS et al., 1974). Dados climáticos coletados em baixa altitude (<200 m) para o período de dois anos revelam que a média das temperaturas mínimas está em torno de 19°C e a média das máximas em torno de 27°C . A precipitação anual varia entre 1800-2000 mm (MELO; MANTOVANI, 1994).

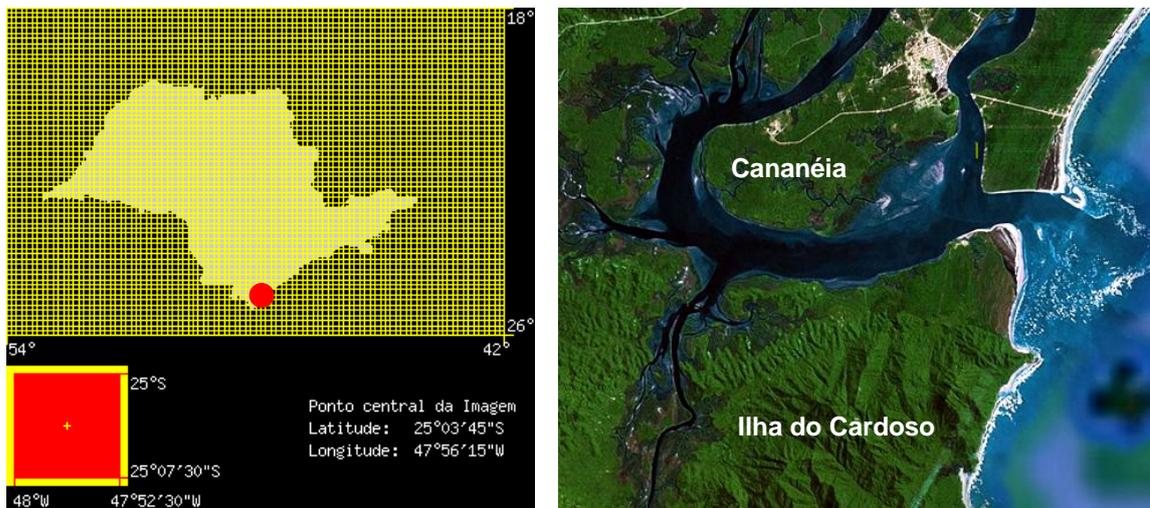


Figura 2.2 - Vista aérea da região da cidade de Cananéia-SP. O círculo em vermelho representa o detalhe na figura da direita (Fonte: Google Earth).

2.2.1.2 Amostragem dos Solos

Amostras de solo foram coletadas em pontos demarcados em solos de mangue e em solos adjacentes (floresta e restinga), no verão de 2006/2007. Foram amostrados três ambientes, sendo: manguezal, floresta e restinga e em cada ambiente foram considerados três pontos geográficos. A amostragem de cada ponto geográfico foi realizada em profundidades e em triplicatas, constituindo 3 pontos em cada ambiente (Figura 2.3).

As amostras de mangue foram coletadas ao longo do gradiente de inundação do manguezal. A transversal tem orientação de 180° S, com início na margem da Baía de Tramandé, estendendo-se até o ambiente terrestre (DIAS, 2008). Foram utilizados tubos de PVC de 50 cm de comprimento por 50 mm de diâmetro, sendo introduzidos de forma vertical no sedimento.

Para as amostras de restinga e floresta foram abertas trincheiras de 1 m x 1m e 60 cm de profundidade, onde as amostras foram coletadas em 5 profundidades diferentes (a cada 10 cm desde a superfície) com tubos de PVC (5 cm de comprimento por 50mm de diâmetro) previamente esterilizados (Figura 2.4).

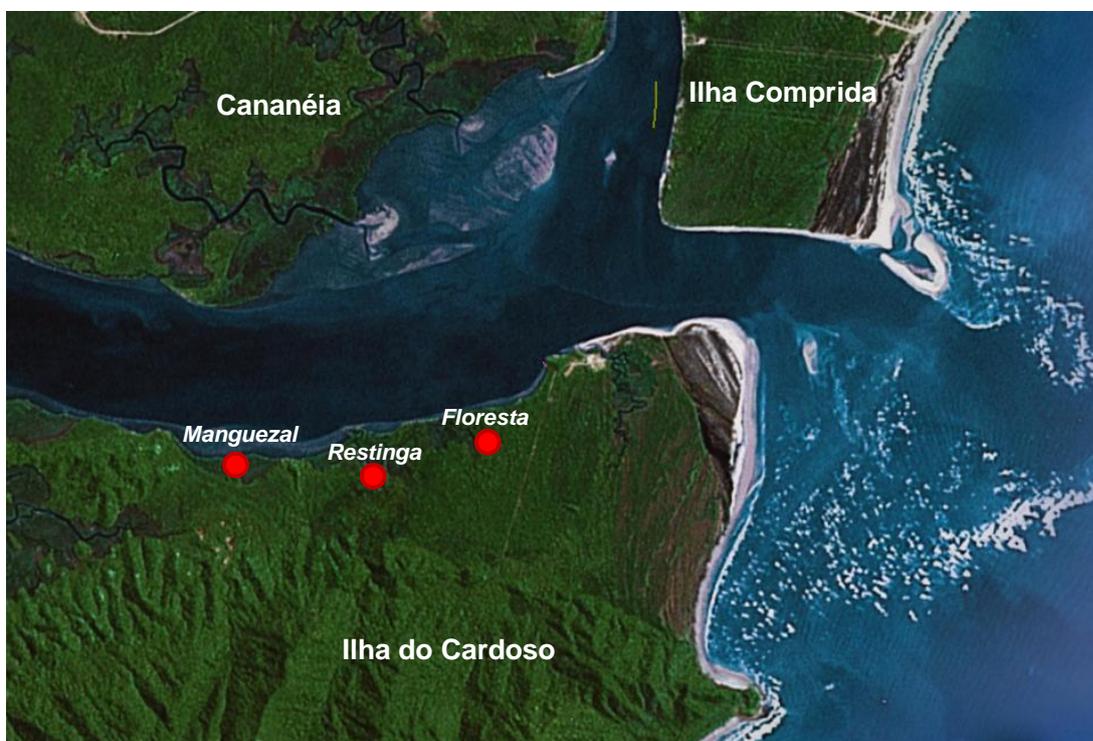


Figura 2.3 - Foto da área de coleta no Parque Estadual da Ilha do Cardoso. Os pontos em vermelho indicam o local de coleta das amostras de manguezal, restinga e floresta, respectivamente (fonte: Google Earth). Coordenadas Geográficas: Manguezal 25°05'6,8"S e 47°57'41,4"W, Restinga 25°04'16,7"S e 47°55'26,1"W, e Floresta 25°04'16,7"S e 47°55'22,6" W.

Após a coleta, as amostras foram armazenadas e mantidas sob baixa temperatura (4°C) em caixas térmicas com gelo e enviadas imediatamente para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP), a fim de iniciar as análises moleculares.

Uma alíquota das amostras foi armazenada em UltraFreezer (Thermo Forma, Forma Scientific) a -80° C para a extração do DNA genômico utilizados nas análises moleculares; outra alíquota foi enviada para o Laboratório de Análises Químicas do Departamento de

Ciência do Solo, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), para a análise das propriedades físico-químicas.



Figura 2.4 – Foto representando a metodologia de coleta das amostras de floresta e restinga. As trincheiras possuíam 1 m x 1 m por 60 cm de profundidade; os canos possuíam 5 cm de comprimento e 5 mm de diâmetro.

2.2.1.3 Extração de DNA Genômico do Solo

Para a extração de DNA total de solo foi utilizado o Kit *Power Soil DNA* (MoBIO, Carlsbad, CA), e seguiu-se o protocolo de acordo com o fabricante, como descrito a seguir:

Uma amostra de 250 mg de solo foi pesada em uma balança analítica TC-403 (Denver Instrument Company) e adicionada ao tubo PowerBead de 2 ml; vortexou-se levemente e adicionou-se 60 μ l da solução C1 invertendo o tubo várias vezes; o tubo foi preso ao Adaptador MoBIO Vortex e vortexou-se por 10 min à velocidade máxima; após o vortex, o tubo foi colocado para centrifugação a 10.000 x g por 30 s; o sobrenadante (aprox. 450 μ l) foi transferido para um novo tubo e então foi adicionado 250 μ l da solução C2 e vortexou-se por 5 s; após essa etapa, incubou-se a 4°C por 5 min; após o tempo de incubação, centrifugou-se a 10.000 x g por 1 min e então 600 μ l do sobrenadante foi transferido para um novo tubo; adicionou-se 200 μ l da solução C3 e vortexou-se por 5 s; após essa etapa, incubou-se novamente a 4°C por 5 min; após o tempo de incubação, centrifugou-se a 10.000 x g por 1 min e transferiu-se 750 μ l do sobrenadante a um novo tubo; adicionou-se 1200 μ l da solução C4 e vortexou por 5 s; após essa etapa, foi carregado 675 μ l da solução no tubo contendo a coluna e então foi centrifugado por 1 min a 10.000 x g; a solução coletada no tubo foi

descartada e mais 675 μl foi carregado na coluna e então centrifugado por 1 min a 10.000 x g; a solução coletada no tubo foi novamente descartada e finalmente, o restante foi aplicado na coluna e centrifugado novamente nas condições anteriores; após, adicionou-se 500 μl da solução C5 na coluna e centrifugou-se a 10.000 x g por 30 s; descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente o tubo vazio por mais 1 min a 10.000 x g; após essa etapa, a coluna foi transferida para um novo tubo e foi adicionado 100 μl da solução C6 no centro da coluna; centrifugou-se por 30 s a 10.000 x g e obteve-se o DNA extraído das amostras.

Para a quantificação da extração, uma alíquota de 5 μl do DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gel) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004). Como padrão molecular foi utilizado 2 μl de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e então foto documentado.

O DNA extraído foi também quantificado em espectrofotômetro, adotando-se a relação de 1,0 de densidade ótica a 260 nm (DO_{260}) como sendo igual a 50 ng de DNA. μl^{-1} (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989).

2.2.1.4 Amplificação do gene 16S rRNA de *Bacteria*

Para as reações de amplificação do gene 16S rRNA de *Bacteria*, foram utilizados os *primers* universais 27f (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 1492r (5' ACC TTG TTA CGA CTT 3') (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). Para a detecção de fluorescência na análise de T-RFLP, a extremidade 5' do *primer* 27f foi marcada com 6-carboxyfluorescein (FAM). A amplificação foi feita em solução contendo: 2,5 μl de tampão para PCR 10X; 1,0 μl de MgCl_2 50 mM; 0,5 μl de dNTP 10 mM; 0,25 μl de BSA 1 ng. μl^{-1} ; 0,2 μl de Platinum[®] Taq Polimerase 5 U (Invitrogen); 0,5 μl de cada *primer* a 5 pmol; 5 μl da amostra de DNA total de solo; e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para volume final de 25 μl . As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 59°C por 45 s e 72°C por 1 min; e uma extensão final de 72°C por 15 min. Uma alíquota de 5 μl do produto de amplificação foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2 μl de *Low mass*

DNA Ladder (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e posteriormente foto documentado.

2.2.1.5 Amplificação do gene 16S rRNA de *Archaea*

Para as reações de amplificação do gene 16S rRNA de *Archaea*, foram utilizados os *primers* ARCH21f (5' TTC YGG TTG ATC CYG CCI GA 3') e ARCH958r (5' YCC GGC GTT GA(I/C) TCC AAT T 3') (DELONG et al., 1992). Para a detecção de fluorescência na análise de T-RFLP, a extremidade 5' do *primer* ARCH21f foi marcada com 6-carboxyfluorescein (FAM). A amplificação foi feita em solução contendo: 2,5 µl de tampão para PCR 10X; 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,5 µl de dNTP 10 mM; 0,25 µl de BSA 1ng.µl⁻¹; 0,2 µl de Platinum[®] Taq Polimerase 5 U (Invitrogen); 1 µl de cada *primer* a 5 pmol; 1 µl da amostra de DNA total de solo; e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para volume final de 25 µl. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 1 min; e uma extensão final de 72°C por 10 min. Como controle negativo nas reações de PCR foi utilizado 1 µl do DNA de *Escherichia coli* (ATCC 25922), cuja cepa foi cedida pelo Laboratório de Materiais de Referência da FIOCRUZ (INCQS). Uma alíquota de 5 µl do produto de amplificação foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2 µl de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e então foto documentado.

2.2.1.6 Amplificação do Espaço Intergênico Ribossomal 18S-28S rRNA de *Fungi*

Para as reações de amplificação do espaço intergênico ribossomal 18S rRNA de fungos, foram utilizados os *primers* 3126Tf (5' ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT 3') e 2234Cr (5' GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC 3') (SEQUERRA et al., 1997). Para a detecção de fluorescência na análise de ARISA, a extremidade 5' do *primer* 3126Tf foi marcada com 6-carboxyfluorescein (FAM). A amplificação foi feita em solução contendo: 2,5 µl de tampão para PCR 10X; 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,5 µl de dNTP 10 mM; 0,2 µl de

Platinum[®] Taq Polimerase 5 U (Invitrogen); 1 µl de cada *primer* a 5 pmol; 3 µl da amostra de DNA total de solo; e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para volume final de 25 µl. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 59°C por 45 s e 72°C por 1 min; e uma extensão final de 72°C por 15 min. Uma alíquota de 5 µl do produto de amplificação foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2 µl de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e posteriormente foto documentado.

2.2.1.7 Purificação dos Produtos de PCR

Para a purificação dos produtos de PCR a serem analisados pelas técnicas de T-RFLP e ARISA foi utilizado o Kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, adicionou-se ao produto de PCR 100 µl de *Capture buffer type 2* e a mistura foi transferida para uma coluna GFX (com filtro), sendo centrifugada a 16.000 x g por 30 s. O filtrado que passou pela coluna foi descartado. Na coluna GFX adicionou-se 500 µl de *Wash buffer type 1* e centrifugou-se a 16.000 x g por 30 s, descartando o filtrado. A coluna foi transferida para um novo tubo e, para a eluição do DNA, foi adicionado 20 µl do *Elution buffer type 4* no centro da membrana. Incubou-se a mistura por 1 min à temperatura ambiente e centrifugou-se a 16.000 x g por 1 min para recolher o DNA purificado. Uma alíquota de 5 µl do DNA purificado foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2 µl de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e fotodocumentado.

2.2.1.8 Reação de Restrição dos Produtos de PCR para Análise de T-RFLP

Os produtos de PCR de *Bacteria* e *Archaea* purificados foram utilizados nas reações de restrição com as endonucleases *HhaI* (GCG[^]C) e *MspI* (C[^]CGG), as quais apresentam melhores resultados para uso em T-RFLP (MARSH et al., 2000). Nas reações foram

utilizados 1,5 µl do Buffer React 10X; 0,15 µl de BSA 1 ng.µl⁻¹; 0,06 µl da endonuclease 10U (Invitrogen); 5 µl do produto de PCR purificado e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para o volume final de 15 µl. As reações de restrição foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 37°C por 3 h e 68°C por 10 min para inativação da endonuclease.

2.2.1.9 Precipitação dos Produtos de Digestão

Após a reação de restrição os produtos digeridos foram precipitados para análise de fragmentos no seqüenciador automático. Para a precipitação foram adicionados 2 µl de tampão Acetato de Sódio/EDTA e 60 µl de etanol absoluto a 15 µl do produto da digestão. A mistura foi agitada levemente no vortex e centrifugada por 15 min a 12.000 x g, descartando o sobrenadante. Foram adicionados 150 µl de etanol 70% recém preparado e centrifugou-se a 12.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi seco em concentrador (Concentrador 5301, Eppendorf) a 45°C por aproximadamente 10 minutos. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até posterior utilização.

2.2.1.10 Análise do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) do Gene 16S rRNA de *Bacteria* e *Archaea*

A análise dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFs) foi feita em seqüenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para o carregamento das amostras no seqüenciador, o produto precipitado foi ressuspensionado em mistura contendo 9,75 µl de Formamida HiDi e 0,25 µl de padrão de comprimento GeneScanTM – 500 ROXTM Size Standard (Applied Biosystems). Antes do carregamento as amostras foram desnaturadas por 5 min a 95°C e resfriadas a 0°C por 4 min.

2.2.1.11 Análise da Variabilidade do Espaço Intergênico Ribossomal (ARISA) 18S-28S de *Fungi*

A análise da variabilidade do espaço intergênico ribossomal foi feita em seqüenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para o carregamento das amostras no seqüenciador foi utilizado 1 ml do produto em mistura contendo 8,75 µl de Formamida HiDi e 0,25 µl de padrão de comprimento MegaBACE™ ET900R Size Standard (GE Healthcare Life Sciences). Antes do carregamento as amostras foram desnaturadas por 5 min a 95°C e resfriadas a 0°C por 4 min.

2.2.1.12 Processamento dos Dados

Após a realização da análise de T-RFLP e ARISA no seqüenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), os dados obtidos foram primeiramente analisados com o programa PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA), sendo inspecionados visualmente para conferir a qualidade das corridas. Após a confirmação da qualidade das corridas, os dados foram exportados em uma matriz para o programa Excel (Microsoft) onde foram organizados para a análise multivariada. Para as amostras de *Bacteria*, uma linha base limite de 50 unidades de fluorescência foi usada para discriminar os “picos verdadeiros” dos ruídos do background proveniente da técnica, e T-RFs menores que 50 pares de base e maiores que 800 foram eliminados de todos os dados (CULMAN et al., 2008). Para amostras de *Archaea* foram eliminados os picos menores que 20 e maiores que 800 pares de base, já para as amostras de fungos foram eliminados abaixo de 50 e acima de 900.

Os dados de altura dos picos (unidades de fluorescência) foram transformados em dados relativos, onde os valores absolutos referentes à intensidade dos picos no eletroferograma e correspondentes aos comprimentos dos fragmentos foram apresentados na forma de valores percentuais de detecção. Essa transformação dos dados foi calculada dividindo cada valor de tamanho de pico pelo valor total dos picos de uma amostra. Isso é análogo em transformar cada altura de pico em dados de porcentagem em relação ao total de valores de altura de pico em uma amostra (CULMAN et al., 2008).

Após a montagem da matriz dos dados, esta foi transformada em uma matriz de distância, usando a medida de Hellinger (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001). As análises estatísticas foram realizadas nos programas Canoco for Windows 4.5 (Biometris, Wageningen, Holanda) e Primer5 (Plymouth Marine Laboratory, Primer-E, Reino Unido).

2.2.2 Resultados e Discussão

2.2.2.1 Coleta e Caracterização dos Solos

Todas as amostras de solo foram coletadas no Parque Estadual da Ilha do Cardoso, em região preservada, de vegetação natural. Para o ambiente de manguezal as amostras foram coletadas nas profundidades 10, 20, 30 e 40 cm; para as amostras de floresta e restinga a coleta foi realizada nas profundidades 10, 20, 30, 40, e 50 cm. A coleta das amostras de manguezal não conseguiu atingir a profundidade de 50 cm devido ao aspecto lodoso e alagado do solo, impossibilitando a coleta de uma amostra estruturada até profundidades maiores. Após a coleta, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, onde uma alíquota foi armazenada a -80°C para extração do DNA e futuras análises moleculares; outra alíquota foi enviada ao Laboratório de Análises Químicas da ESALQ/USP para análise das características químicas das amostras de solo (Tabela 2.1). A Análise de Componentes Principais realizada com os dados químicos do solo revelaram agrupamentos distintos para os três ambientes estudados, onde se observa que as amostras de manguezal apresentaram valores maiores de pH, matéria orgânica (M.O.), potássio (K) e magnésio (Mg) e teores menores ferro (Fe) e cobre (Cu) quando comparadas com as amostras de floresta e restinga (Figura 2.5). Esses valores em destaque para as amostras de manguezal confirmam os dados já apresentados por Dias (2008), Nunes (2006) e Cury (2006).

As propriedades do solo possuem um importante papel na nutrição da flora e fauna dos ambientes de manguezais (KATHIRESAN; BINGHAN, 2001). Algumas importantes características são o pH, troca catiônica, condutividade elétrica e o teor de silte (PEZESHKI; DELAUNE; MEEDER, 1997). Porém, o fator mais importante parece ser a concentração de nutrientes, onde, seu fluxo está intimamente relacionado com a assimilação por plantas e a mineralização microbiana (ALONGI, 1996; MIDDELBURG et al., 1996). Neste estudo, o teor de nutrientes apresentou uma diminuição com o aumento da profundidade, evidenciando uma maior concentração nos primeiros 20 cm amostrados.

Tabela 2.1 – Caracterização química das amostras dos solos utilizados na pesquisa.

Ambiente	Amostra	Profundidade	pH CaCl ₂	M.O. g.dm ⁻³	P mg.dm ⁻³	S mg.dm ⁻³	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	T	V	m	mg.dm ⁻³				
																B	Cu	Fe	Zn	
Mangue		10 cm	6.3	93	5	-	4.1	14	58	-	-	-	-	-	-	0.1	0.2	281	2.92	0.6
		20 cm	6.4	67	4	-	3.2	8	50	-	-	-	-	-	-	0.05	0.07	59.13	1.08	0.05
		30 cm	6.3	54	3	-	3.2	18	53	-	-	-	-	-	-	0.04	0.06	55.12	0.96	0.06
		40 cm	5.9	38	3	-	1.2	10	15	-	-	-	-	-	-	0.02	0.02	53.0	0.96	0.06
Restinga		10 cm	3.2	86	18	8	1.3	3	3	20	205	7.3	212.3	3	73	0.18	0.2	267	1.9	1.2
		20 cm	3.3	75	10	4	1	2	1	24	228	4	232	2	86	0.2	0.2	294	0.7	0.8
		30 cm	3.2	69	8	3	0.7	1	1	25	185	2.7	187.7	1	90	0.18	0.22	281	0.4	0.6
		40 cm	3.8	64	5	2	0.5	1	1	35	228	2.5	230.5	1	93	0.14	0.2	275	0.2	0.5
Floresta		50 cm	4.0	20	2	3	0.1	1	1	15	98	2.1	100.1	2	88	0.16	0.1	23	-	0.3
		10 cm	5.3	87	22	10	1.5	51	25	0	42	77.5	119.5	65	0	0.24	0.4	100	19.5	1.8
		20 cm	3.9	45	6	5	0.5	9	6	14	109	15.5	124.5	12	47	0.26	0.3	169	4.4	0.8
		30 cm	3.8	29	3	4	0.3	2	2	23	98	4.3	102.3	4	84	0.24	0.2	173	1.9	0.4
Floresta		40 cm	3.9	21	1	12	0.3	1	1	20	98	2.3	100.3	2	90	0.22	0.2	151	0.8	0.3
		50 cm	3.9	19	1	24	0.2	1	1	20	80	2.2	82.2	3	90	0.22	0.2	272	0.9	0.4

(-) Resultado <0,1 ou não determinado; Cu, Fe, Mn, Zn (DTPA - TEA; pH 7,3; B = BaCl₂.2H₂O, 0,125% microondas (10 ml TFSA/20ml BaCl₂ 0,125%).

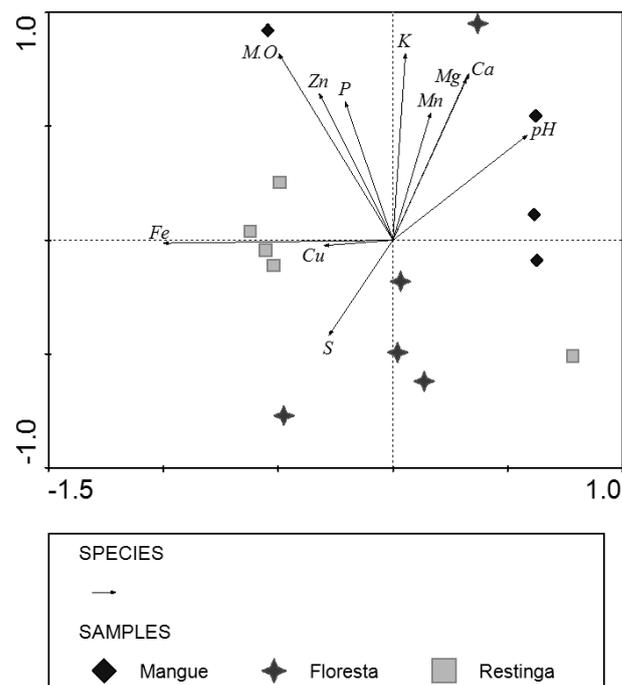


Figura 2.5 - Análise de Componentes Principais baseada nos elementos químicos dos solos de mangue, floresta e restinga. Os eixos 1 e 2 apresentaram valores de explicabilidade de 89,4% e 7,1% respectivamente.

2.2.2.2 Extração do DNA Genômico Total do Solo

Foram realizadas três extrações de DNA genômico do solo para cada ponto amostral, totalizando 12 extrações para o ambiente de manguezal e 15 extrações para os ambientes de restinga e floresta. Algumas amostras não apresentaram qualidade na primeira extração, sendo repetido o procedimento para essas amostras. A concentração do DNA extraído variou em cada amostra segundo quantificação em espectrômetro, de $40 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a $300 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Testes de amplificação foram previamente realizados com as amostras de DNA extraído, onde todas as amostras apresentaram resultados positivos com uma alíquota diluída 10X, desta forma, padronizando a diluição utilizada na pesquisa.

2.2.2.3 Amplificação e Purificação dos Fragmentos de DNA

Alíquotas do DNA extraído das amostras de solo diluídas 10X apresentaram melhores resultados na amplificação, gerando produtos de PCR suficientes para a continuidade do trabalho. Nas reações de amplificação do gene 16S rRNA do grupo *Bacteria* foram utilizados

os *primers* 27f-FAM e 1498r, universais para o grupo, que amplificaram regiões do genoma de tamanho esperado, com aproximadamente 1500 pb. Na amplificação do gene 16S rRNA do grupo *Archaea*, foram utilizados os *primers* 21f-FAM e 958r, amplificando regiões do genoma de tamanho esperado, com aproximadamente 950 pb. Para a amplificação da região do espaço intergênico ribossomal 18S-28S do grupo *Fungi* foram utilizados os *primers* 3126Tf-FAM e 2234Cr, também apresentando resultado ideal para a continuação das análises.

Alguns diferentes fluoróforos têm sido utilizados com sucesso na análise de T-RFLP e ARISA, incluindo HEX, FAM e ROX (THIES, 2007); porém, Ranjard et al. (2001) mostrou que a fluorescência FAM provê uma maior eficiência na PCR, apresentando uma maior intensidade de fluorescência total dos perfis, mas também contribuem para o aumento dos ruídos de fluorescência não-específica, o que pode impedir a detecção de alguns picos. Neste estudo somente os *primers forward* foram marcados com fluorescência FAM, pois estas regiões da subunidade menor do rRNA apresentam maior heterogeneidade (MOESENEDER et al., 2001).

Após a visualização dos resultados da amplificação em gel de agarose 1% as amostras foram purificadas com o Kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). Edel-Hermann et al. (2004) mostraram que a digestão de produtos de PCR não purificados geraram perfis de T-RFLP não consistentes para algumas amostras, nas quais a fluorescência residual de *primers* poderiam interferir na separação correta dos fragmentos terminais de restrição pelo seqüenciador automático.

2.2.2.4 Análise dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) de *Bacteria* e *Archaea*

Após a purificação dos produtos de PCR, as amostras de *Bacteria* e *Archaea* foram submetidas a uma reação de restrição utilizando as endonucleases *MspI* e *HhaI*, gerando fragmentos terminais de restrição (T-RFs). Após a reação de restrição, as amostras foram precipitadas e então levadas ao seqüenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os arquivos gerados foram analisados previamente no programa PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) para a avaliação da qualidade das corridas no seqüenciador e uma matriz foi exportada para o programa Excel (Microsoft), onde as planilhas de dados foram organizadas para a análise nos programas Canoco 4.5 (Biometris, Wageningen, Holanda) e Primer5 (Plymouth Marine Laboratory, Primer-E, Reino Unido).

Como já mencionado, os dados de altura dos picos (unidades de fluorescência) foram transformados em dados relativos para minimizar as diferenças da quantidade de DNA entre as amostras (CULMAN et al., 2008). De acordo com Clement et al. (1998), ecólogos microbianos devem ser cautelosos quando determinam que cada T-RFs seja uma espécie única ou uma única UTO, pois múltiplos organismos podem compartilhar T-RFs similares ou mesmo idênticos. Exceto quando se trabalha com um organismo isolado, *primers* para grupos específicos apresentam T-RFs freqüentemente ambíguos, limitando o pesquisador de extrair o máximo de informação dos dados. Para minimizar este problema todas as análises foram realizadas com duas endonucleases. Outros ruídos nos dados, como eficiência na purificação do DNA, erros de pipetagem e estrutura das comunidades são minimizados quando os dados são transformados em valores relativos (DUNBAR; TICKNOR; KUSKE, 2001).

A partir das planilhas organizadas, foram realizadas ordenações estatísticas (PCA e NMDS) e análise de riqueza.

2.2.2.5 Análise da Variabilidade do Espaço Intergênico Ribossomal de *Fungi* (ARISA)

Para a análise de ARISA as amostras de *Fungi* não precisam ser submetidas a uma reação de restrição, pois o fragmento amplificado possui um polimorfismo natural, sendo possível uma análise direta no seqüenciador (FISHER; TRIPLETT, 1999). Após a purificação, as amostras foram ressuspensas em água ultrapura (Milli-Q) esterilizada e, uma alíquota de 1 µl foi utilizada para a análise no seqüenciador.

Os procedimentos para análise dos dados foram os mesmos utilizados para as amostras de T-RFLP, como citado no item 2.2.2.5.

2.2.2.6 Resultados da Análise de T-RFLP de *Bacteria* e *Archaea* e ARISA de *Fungi*

Os resultados dos eletroferogramas das análises de T-RFLP e ARISA das comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* são mostrados nas Figuras 2.6, 2.7 e 2.8, respectivamente.

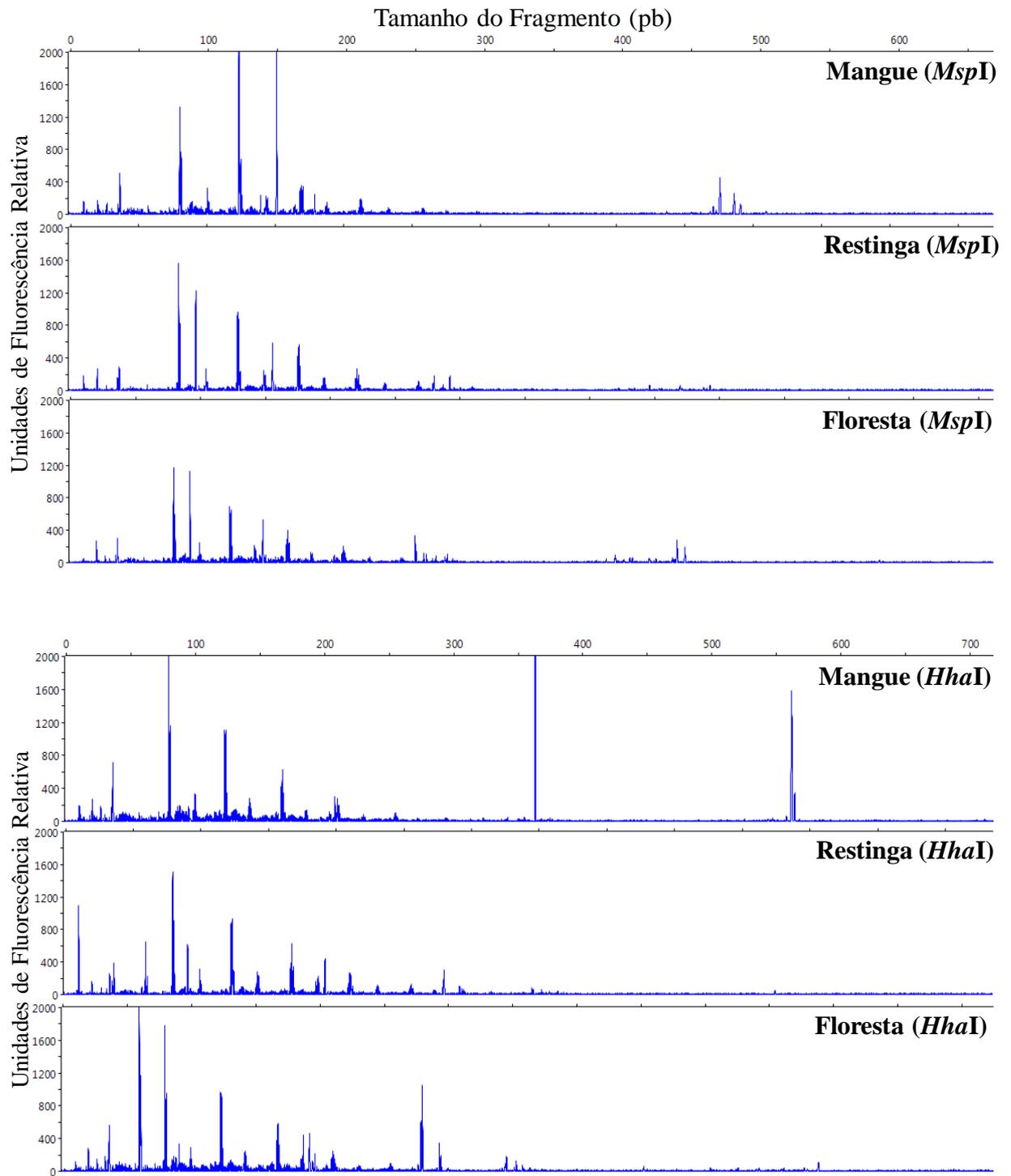


Figura 2.6 - Eletroferogramas das comunidades de *Bacteria* dos solos de mangue, floresta e restinga. Resultados de T-RFLP obtidos com a utilização das enzimas *MspI* e *HhaI*.

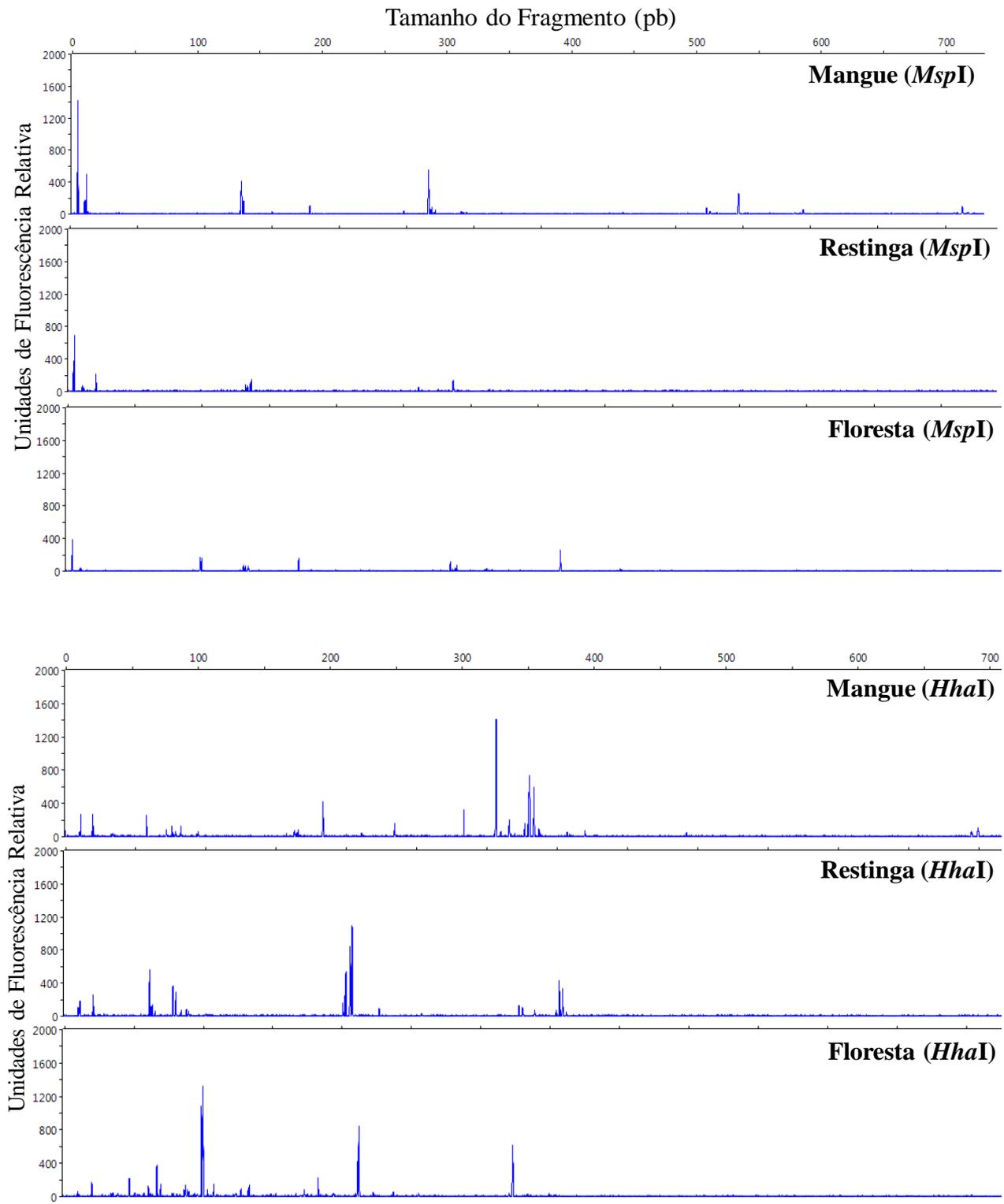


Figura 2.7 - Eletroferogramas das comunidades de *Archaea* dos solos de mangue, floresta e restinga. Resultados de T-RFLP obtidos com a utilização das enzimas *MspI* e *HhaI*.

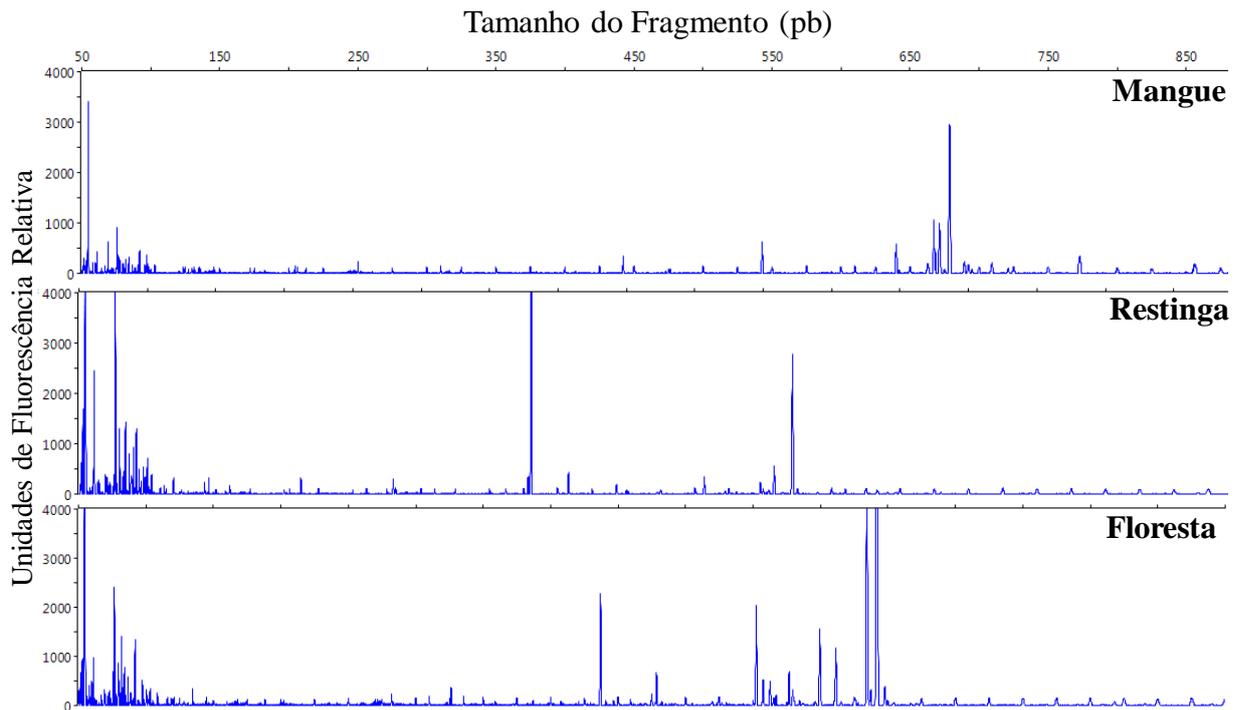


Figura 2.8 - Eletroferogramas das comunidades de *Fungi* dos solos de mangue, floresta e restinga obtidos pela técnica de ARISA.

Uma análise visual prévia dos eletroferogramas mostrou uma nítida diferença na estrutura das comunidades estudadas entre os ambientes de manguezal, restinga e floresta. É possível notar a presença de picos que aparecem no eletroferograma de um ambiente e que não estão presentes em outros, evidenciando UTO's exclusivas em cada ambiente. Desta forma, os ambientes estudados foram caracterizados por um perfil de eletroferograma, mostrando o potencial das técnicas de T-RFLP e ARISA em discriminar as estruturas das comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* em solos. Os eletroferogramas das comunidades de *Bacteria* e *Fungi* apresentaram uma maior presença de picos quando comparados com as amostras de *Archaea*, sugerindo uma maior diversidade desses grupos, o que já é esperado, dado que a diversidade bacteriana e fúngica é reconhecidamente maior que a diversidade de *Archaea* num mesmo ambiente (ALLER; KEMP, 2008). Diferenças na diversidade nas amostras ambientais sugerem possíveis diferenças nos papéis ecológicos de *Archaea*, *Bacteria* e *Fungi*.

Após a análise visual dos eletroferogramas, matrizes de dados foram geradas e, no programa Canoco 4.5, elas foram convertidas em matrizes de distância, utilizando o índice de Hellinger (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001), recomendado para análises de T-RFLP. Alguns estudos utilizam o índice de Bray-Curtis, porém, matematicamente este índice não dá

um grande peso aos dados faltantes (igual a zero), os quais aparecem com muita frequência nas matrizes geradas pelo T-RFLP e ARISA; dessa forma, o índice de Hellinger é mais adequado à análise (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001; PERES-NETO et al., 2006).

Os perfis de T-RFLP e ARISA foram comparados calculando a abundância relativa dos fragmentos terminais de restrição (T-RFs, sendo considerada uma UTO distinta) para os três ambientes. As análises de T-RFLP e ARISA podem dar uma visão semi-quantitativa da comunidade por meio da abundância relativa dos picos, os quais representam os membros de uma comunidade numa reação de PCR (BRAKER et al., 2001; SESSITSCH et al., 2001). Histogramas são mostrados para os fragmentos com abundância relativa >1% (Figura 2.9), sendo considerados UTO's de organismos dominantes nessas comunidades (LEHOURS et al., 2005).

Para as comunidades de *Bacteria*, resultados com ambas as enzimas apresentaram 20 T-RFs com fluorescência relativa >1%, representando aproximadamente 60% da fluorescência total. Em geral, tanto para a enzima *MspI* quanto para *HhaI*, as amostras de manguezal apresentaram alguns T-RFs dominantes, sendo mais abundantes do que outros, diferindo das amostras de restinga e floresta. Para a enzima *MspI*, o perfil dos T-RFs dominantes dos ambientes de restinga e floresta foram muito semelhantes entre si, indicando uma similaridade na estrutura das comunidades de *Bacteria* desses dois ambientes e diferindo do ambiente de manguezal. Para a enzima *HhaI* o mesmo ocorre, exceto pelo T-RF de 60 pb, que possui uma maior abundância no ambiente de floresta. É possível notar também a presença de alguns T-RFs em um ambiente que não aparecem em outros, evidenciando a presença de algumas UTO's exclusivas em cada ambiente. Essas observações sugerem uma clara diferença estrutural nas comunidades de *Bacteria* entre os três ambientes estudados, sendo que o manguezal apresenta uma característica distinta dos ambientes de restinga e floresta, que se assemelham em alguns aspectos.

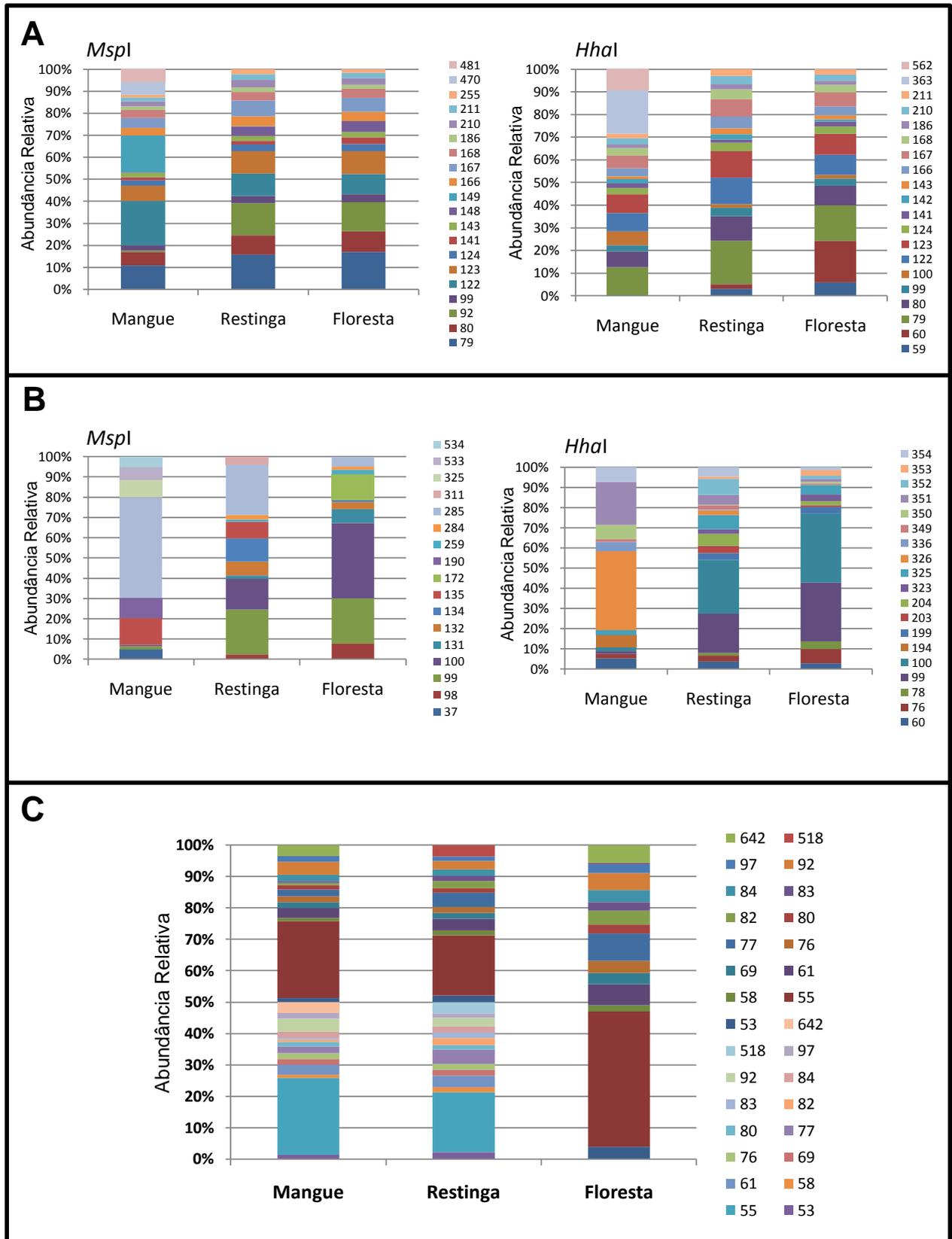


Figura 2.9 - Abundância relativa de T-RFs de comunidades de *Bacteria* (A) e *Archaea* (B) do gene 16S rRNA. Diagramas mostram os resultados depois de clivagem com *MspI* e *HhaI*. (C) Abundância relativa dos fragmentos do espaço intergênico ribossômico 18S-28S de *Fungi*. Os números na legenda indicam o tamanho dos fragmentos, em pares de bases, para fragmentos com abundância relativa >1%.

Para as comunidades de *Archaea*, os resultados com a enzima *MspI* apresentaram 17 T-RFs com fluorescência relativa >1%, representando aproximadamente 93% da fluorescência total; resultados com a enzima *HhaI* apresentaram 19 T-RFs com fluorescência relativa >1%, representando aproximadamente 86% da fluorescência total das amostras. É possível notar uma menor riqueza de T-RFs dominantes para o domínio *Archaea* quando comparado com *Bacteria*, isso é devido a uma menor quantidade de picos, evidenciando uma menor diversidade desses organismos nos ambientes estudados, confirmando o que já foi observado por Aller e Kemp (2008), onde eles observaram que as comunidades de *Archaea* são menos diversas que as comunidade de *Bacteria* num mesmo ambiente. Observações no histograma (Figura 2.9) revelam que o ambiente de manguezal apresenta T-RFs dominantes diferentes daqueles presentes nos ambientes de restinga e floresta, resultados similares aos apresentados para as comunidades de *Bacteria*, onde os ambientes de restinga e floresta se assemelham entre si, mas diferem do ambiente de manguezal.

Para as comunidades de *Fungi*, 15 T-RFs apresentaram fluorescência relativa >1%, representando apenas 43% da fluorescência total. Ao contrário do que aconteceu com as comunidades de *Bacteria* e *Archaea*, os T-RFs dominantes das comunidades de fungos não representam a maioria dos membros dessa comunidade, o que indica uma alta diversidade fúngica nesses ambientes. Porém, a técnica utilizada para analisar essa comunidade foi diferente da utilizada para as outras. Apesar de as técnicas serem bastante semelhantes quanto ao procedimento, o T-RFLP se baseia no gene 16S rRNA, enquanto o ARISA se baseia no espaço intergênico ribossomal. Um estudo realizado com amostras de solo comparou as duas técnicas e sugeriu que os resultados de ambas as técnicas estão muito relacionados (HARTMANN et al., 2005). Observações no histograma (Figura 2.9) mostram uma homogeneidade na distribuição dos T-RFs dominantes nos três ambientes estudados, o que difere dos resultados obtidos para as comunidades de *Bacteria* e *Archaea*.

Para testar a diferença na composição das comunidades, a análise de similaridade ANOSIM e a porcentagem de similaridade SIMPER (ambos os testes calculados com base no coeficiente de similaridade de Bray-Curtis) foi realizada utilizando o programa Primer5 (CLARKE, 1993). ANOSIM é um teste estatístico baseado em permutação, análogo ao teste ANOVA, o qual testa a diferença entre grupos de amostras de diferentes locais e tratamentos experimentais (YANNARELL; TRIPLETT, 2004; DANOVARO et al., 2006). O teste de SIMPER é um teste estatístico que avalia a diferença entre grupos expressando os resultados em valores percentuais de dissimilaridade. Estes dados estão apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Índices de dissimilaridade ANOSIM e SIMPER obtidos usando as técnicas de T-RFLP e ARISA considerando os Domínios Bacteria, Archaea e Fungi nos solos de manguezal, restinga e floresta.

Ambiente	Bacteria			Archaea			Fungi	
	ANOSIM ^a	SIMPER ^b		ANOSIM	SIMPER		ANOSIM	SIMPER
	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>	<i>HhaI</i>		
Mangue X Restinga	0,757*	0,630*	51,38%	0,275	0,836*	75,57%	0,123	53,98%
Mangue X Floresta	0,658*	0,640*	51,34%	0,918*	0,979*	94,34%	0,260	52,25%
Restinga X Floresta	0,307	0,414	34,16%	0,293	0,168	73,39%	0,123	53,79%

^aANOSIM testa a diferença entre amostras. Valores de “i” são expressos, todos com $p < 0,001$. Valores $> 0,75$ são estatisticamente diferentes; $> 0,5$ possuem sobreposição mas ainda são claramente diferentes; e $< 0,5$ não apresentam diferença estatística.

^bSIMPER, quanto maior a porcentagem maior a dissimilaridade entre as amostras.

*valores de ANOSIM estatisticamente diferentes.

De forma geral, as comunidades microbianas do ambiente de manguezal diferiram dos ambientes de restinga e floresta, estes que apresentaram certo nível de semelhança entre si. Essa diferença estrutural de comunidades microbianas pode estar relacionada às diferenças morfo-fisiológicas do manguezal em relação aos outros ambientes. Diferente da floresta e da restinga, o manguezal se caracteriza por apresentar áreas alagadas, salinas, de substratos siltosos inconsolidados e com baixo teor de oxigênio (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000). Outra característica importante de manguezais é a alta produção de matéria orgânica, principalmente serrapilheira. A produção total de serrapilheira de um manguezal é função da taxa de renovação da água dentro do ecossistema, que, por sua vez, está relacionada a características topográficas, maregráficas e forçantes meteorológicas (POOL; LUGO; SNEDAKER, 1975).

Também foi calculado o índice de Pielou (J') (PIELOU, 2000), que mede a equitabilidade das amostras, indicando a proporção dos indivíduos de cada uma das espécies presentes em uma comunidade em relação ao total de indivíduos desta mesma comunidade. Quanto maior a equitabilidade das amostras, mais robustos são os resultados. Através dos dados apresentados na Tabela 2.3 é possível notar que todas as amostragens apresentaram um alto valor de equitabilidade, exceto para a amostragem de comunidades de *Archaea* no ambiente de floresta, utilizando a enzima *MspI*.

Tabela 2.3 - Equitabilidade^a das amostras obtidas usando T-RFLP e ARISA.

Ambiente	<i>Bacteria</i>		<i>Archaea</i>		<i>Fungi</i>
	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>	
Mangue	0,825	0,840	0,855	0,801	0,821
Restinga	0,874	0,878	0,960	0,815	0,793
Floresta	0,896	0,868	0,470	0,809	0,783

^aÍndice de Pielou, quanto mais próximo de 1 maior é a equitabilidade da amostragem.

2.2.2.7 Estruturas das Comunidades Microbianas no Perfil Manguezal-Restinga-Floresta

A análise de Componentes Principais dos perfis de T-RFLP e ARISA das estruturas de comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* dos solos de mangue, floresta e restinga são mostradas na Figura 2.10.

Para as comunidades de *Bacteria*, as amostras foram separadas de forma distinta no gráfico de ordenação, sendo a variabilidade das amostras explicada 100% nos dois primeiros eixos plotados. Os agrupamentos definidos no gráfico de ordenação demarcaram posições correspondentes à dos ambientes estudados no contexto da paisagem local, onde a restinga situa-se como um ambiente de transição entre o manguezal e a floresta. A topologia global do gráfico feito através das duas endonucleases (*MspI* e *HhaI*) foi muito similar, mostrando confiabilidade nos dados. As amostras de mangue e floresta formaram um agrupamento mais distinto, sendo o manguezal o mais separado entre os ambientes. As amostras de restinga foram plotadas próximas as amostras de floresta, revelando uma maior similaridade entre os dois ambientes.

Para as comunidades de *Archaea*, as amostras foram plotadas de forma mais dispersa, porém mantendo a ordenação similar à plotada para as comunidades de *Bacteria*. Desta forma, a distribuição da estrutura das comunidades de *Archaea* seguiu o mesmo padrão que as comunidades de *Bacteria*. A topologia global do gráfico realizado com a endonuclease *HhaI* apresentou uma melhor definição dos agrupamentos, porém, não muito diferente da enzima *MspI*; em ambos os gráficos, os dois primeiros eixos explicaram 100% da variação total dos dados. Para esse grupo, as amostras de restinga foram plotadas entre as amostras de mangue e floresta, evidenciando o comportamento transicional das comunidades desse ambiente, como o observado na paisagem natural.

Para as comunidades de *Fungi*, as amostras de manguezal apresentaram um agrupamento mais distinto em relação às amostras de floresta e restinga, formando um grupo bem definido. As amostras de floresta e restinga foram plotadas de forma mais dispersa na ordenação, em alguns casos se sobrepondo, evidenciando uma maior similaridade entre esses dois ambientes.

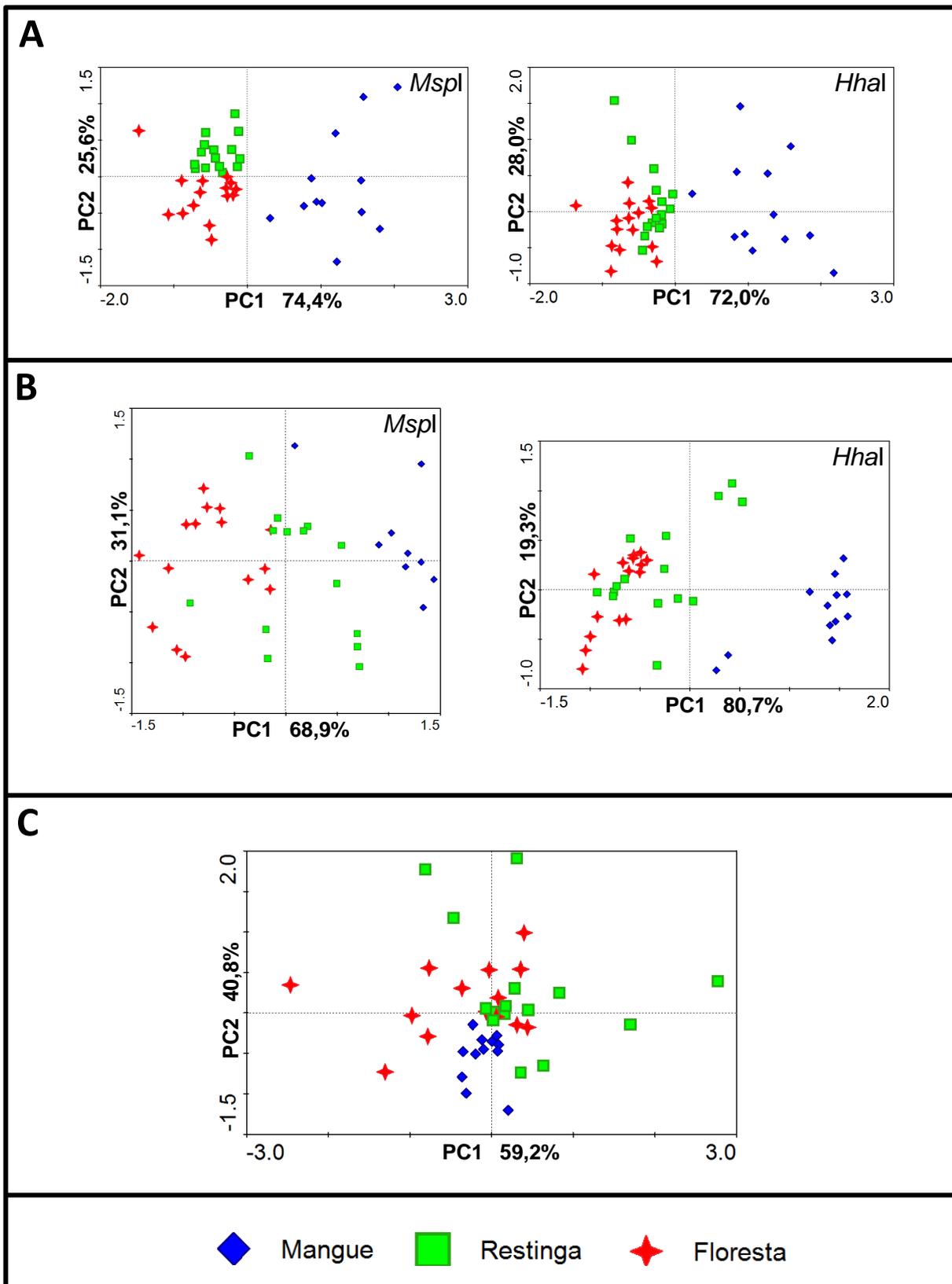


Figura 2.10 - Análises de Componentes Principais das comunidades microbianas dos solo estudados. (A) PCA das estruturas de comunidades de *Bacteria* determinadas por T-RFLP com as enzimas *MspI* e *HhaI*. (B) PCA das estruturas de comunidades de *Archaea* determinadas por T-RFLP com as endonucleases *MspI* e *HhaI*. (C) PCA das estruturas de comunidades de *Fungi* determinadas por ARISA. O valor correspondente à explicabilidade de cada eixo se encontra ao lado do gráfico.

De modo geral, a PCA realizada com os dados de T-RFLP e ARISA das comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* revelou diferenças estruturais na composição dessas comunidades nos ambientes estudados, formando grupos claramente definidos para cada ambiente amostrado. Os resultados de T-RFLP e ARISA também foram sensíveis em revelar a transição das microbianas na transecção ambiental estudada, como observado na paisagem local, onde a restinga se situa numa posição de transição entre o ambiente de manguezal e o de floresta. Isso fica mais evidente para as comunidades de *Bacteria* e *Archaea*, e um pouco menos para as comunidades de *Fungi*. Pode-se notar também que as amostras de floresta e restinga se agrupam de forma mais próximas entre si, confirmando os dados de ANOSIM e SIMPER, onde o manguezal difere dos outros ambientes.

2.2.2.8 Relação das Comunidades Microbianas com os Atributos dos Solos

Análises estatísticas multivariadas associadas a técnicas independentes de cultivo têm sido utilizadas como forma de dimensionar e aumentar a informação de grupos de organismos em relação às condições ambientais, flutuações sazonais e diferentes aspectos do local estudado, como os atributos físico-químicos do solo (HITZL et al., 1997; XU, 2006; RAMETTE, 2007).

A análise de NMDS (*Non-metric Multidimensional Scaling*) é uma técnica de ordenação utilizada em análises ecológicas que tem por objetivo descrever a estrutura de uma matriz complexa, reduzindo a dimensionalidade da matriz de dados e ordenando os objetos num gráfico. Essa técnica procura garantir que as distâncias entre os objetos no espaço plotado seja proporcional às distâncias entre os objetos no espaço multidimensional original, dessa forma, pontos que foram plotados próximos apresentam maior similaridade entre si.

Os dados de T-RFLP e ARISA foram correlacionados com os valores das propriedades químicas dos solos e ordenados utilizando a análise de NMDS, obtendo-se ordenações espaciais baseadas no índice de Hellinger. As ordenações espaciais definidas para cada comunidade microbiana, combinada com os atributos químicos do solo são mostradas na Figura 2.11.

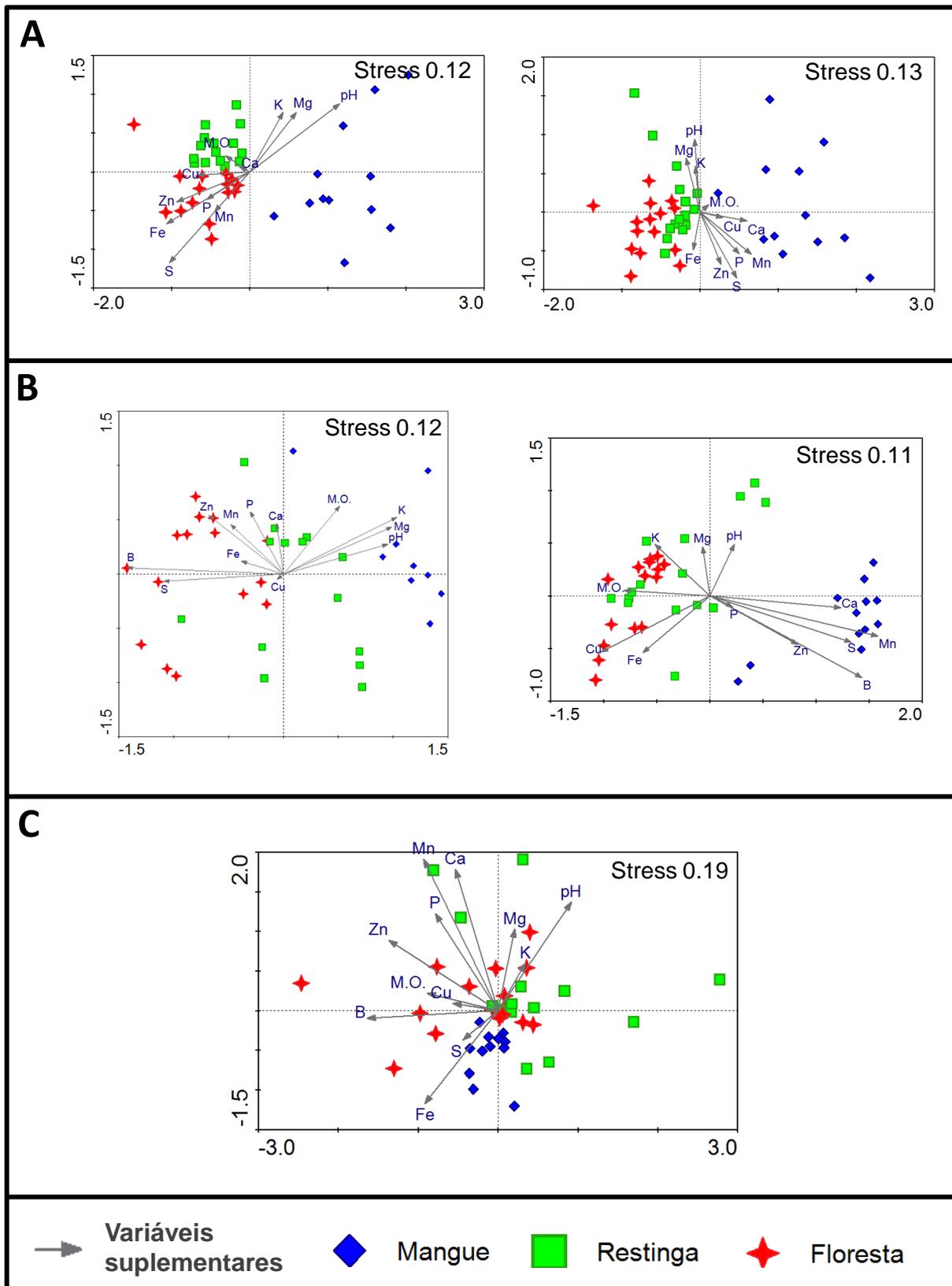


Figura 2.11 - *Non-metric multidimensional scaling* das comunidades microbianas dos solos estudados. (A) NMDS das estruturas de comunidades de *Bacteria* determinadas por T-RFLP com as enzimas *MspI* e *HhaI*. (B) NMDS das estruturas de comunidades de *Archaea* determinadas por T-RFLP com as endonucleases *MspI* e *HhaI*. (C) NMDS das estruturas de comunidades de *Fungi* determinadas por ARISA.

A análise de NMDS dos perfis de T-RFLP mostrou que as comunidades de *Bacteria* dos diferentes ambientes estudados diferem em estrutura e essas diferenças estão pouco relacionadas aos atributos químicos do solo, pois estes explicam apenas 22,1% e 28,3% da variabilidade total dos dados respectivamente para as endonucleases *MspI* e *HhaI*. Entre os atributos analisados, o pH, enxofre (S), ferro (Fe) e o potássio (K) são os que mais estão relacionados com a variabilidade das amostras. As amostras de mangue se relacionaram com maiores valores de pH, magnésio (Mg) e K, enquanto as amostras de floresta e restinga com maiores valores de S e Fe.

A análise de NMDS dos perfis de T-RFLP para as comunidades de *Archaea* revelou que as diferenças na estrutura dessas comunidades nos diferentes ambientes estão bastante relacionados com os atributos químicos dos solos, que explicam 74,7% e 59,7% da variabilidade total dos dados para as endonucleases *MspI* e *HhaI*, respectivamente. Entre os atributos analisados, o pH, Matéria Orgânica (M.O.), boro (B) e o S são os que mais estão relacionados com a variabilidade das amostras. Para essa comunidade, as amostras de mangue se relacionaram com maiores valores de pH e Mg.

A análise de NMDS dos perfis de ARISA para as comunidades de *Fungi* não apresentou agrupamentos muito definidos para os três ambientes, porém agrupou de uma forma distinta as amostras de mangue. A variabilidade dos dados está pouco relacionada com os atributos químicos do solo, que explicam apenas 30,7% da variação total dos dados. Entre os atributos analisados, o pH, Fe, manganês (Mn), e o zinco (Zn) são os que mais estão relacionados com a variabilidade das amostras. Para a comunidade de *Fungi*, as amostras de mangue mostraram maior relação com maiores valores de Fe e S.

Os resultados mostram que as diferenças nas estruturas das comunidades microbianas nos solos estudados estão correlacionadas com as mudanças nos atributos do solo, porém, em alguns casos como *Bacteria* e *Fungi*, a explicabilidade da variação foi pouco correlacionada aos atributos químicos do solo. Esta correlação pode ter sido pequena em função da amostragem, onde foi realizado um estudo em profundidade, chegando até a 50 cm. Estudos com comunidades microbianas de solos tropicais mostraram uma alta relação com os atributos do solo, analisando, porém as primeiras profundidades (até 20 cm), onde há uma maior concentração de nutrientes (FIERER; JACKSON, 2006; CANNAVAN, 2007; JESUS et al., 2009). Com o aumento da profundidade é normal que ocorra uma diminuição do teor de nutrientes do solo e isso também reflete na diversidade das comunidades microbianas. Neste estudo observou-se que as comunidades de *Bacteria* e *Fungi* apresentaram maior riqueza de

UTO's nas primeiras camadas dos solos estudados, o que é corroborado por dados de outros estudos já realizados com diversidade microbiana em solos (TORSVIK; GOKSOYR; DAAE, 1990; BORNEMAN; TRIPLETT, 1997; TSAI et al., 2003; FIERER; JACKSON, 2006; MEDAU, 2007).

Por outro lado, as comunidades de *Archaea* se correlacionaram bastante com os atributos do solo, visto que esses organismos são conhecidamente habitantes de lugares extremos, adaptando-se a maiores profundidades do solo. Os resultados revelaram uma maior riqueza de UTO's para o grupo de *Archaea* nas amostragens mais profundas (30 a 50 cm), o que pode ter sido a razão da alta correlação desse grupo com os atributos do solo.

Em todas as análises realizadas, o pH apareceu como um atributo bastante correlacionado com a variabilidade dos dados, junto com outros elementos que contribuem para a alteração do pH em solos, como o Fe e o K. Fierer e Jackson (2006), realizaram estudo de biogeografia e diversidade de comunidades bacterianas em solos da América do Norte e Sul e observaram que o pH foi, de longe, o atributo que melhor predisse a diversidade e a riqueza de espécies bacterianas. Em estudo realizado em solos da Amazônia Ocidental, a diversidade de comunidades bacterianas esteve bastante correlacionada com a acidez do solo, com atributos como pH, $[Al^{3+}]$, potencial de acidez e saturação de bases (JESUS et al., 2009).

Em solos de manguezal, a dinâmica de nutrientes é diferente dos solos de floresta e restinga, sendo considerados ecossistemas altamente produtivos devido ao intenso suprimento de nutrientes, provenientes tanto do mar quanto do continente (GETTER et al., 1984; WOODWEL et al., 1977). Dias (2008), em estudo realizado com o mesmo manguezal utilizado nesta pesquisa, mostrou que a capacidade de suporte não varia com a profundidade, porém apresentou diferença na estrutura de comunidades de bactérias em função da profundidade. Em estudo realizado em ambiente de manguezal contaminado com petróleo no Brasil, as estruturas das comunidades de *Bacteria* variaram de acordo com a contaminação, enquanto as comunidades de *Archaea* variaram de acordo com a profundidade (CURY, 2002; NUNES, 2006).

Desta forma, as diferenças observadas nas estruturas de comunidades microbianas nesta pesquisa refletem as diferenças ambientais observadas nos três ambientes estudados, pois estes apresentam características físico-químicas diferentes. Estas características, juntamente com a atividade biológica de 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).

2.2.2.9 Análise de Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais

A partir dos dados obtidos com as técnicas de T-RFLP e ARISA, foram analisados os dados de riqueza de UTO's, onde, para cada T-RF encontrado no perfil de uma comunidade, uma UTO foi considerada. Como os experimentos foram considerando três repetições biológicas, se um pico de fluorescência estivesse presente em apenas uma das triplicatas, esse T-RF seria considerado como presente no ambiente, minimizando, assim, o efeito de organismos dominantes. A Figura 2.12 mostra os gráficos de riqueza de UTO's das comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* dos três ambientes estudados no experimento. Também foram construídos diagramas de Venn (FAUTH et al., 1996) para verificar as intersecções e peculiaridades entre os ambientes, identificando o número de UTO's exclusivas e compartilhadas entre mangue, floresta e restinga (Figura 2.12).

Para as comunidades de *Bacteria*, as amostras que apresentaram maior riqueza foram de floresta, mangue e restinga, nessa ordem. Para as amostras de florestas o número de UTO's variou entre 80 e 160; para as amostras de mangue variou entre 140 e 160; e para as amostras de restinga variou entre 80 e 160. Pode-se notar também que as primeiras profundidades (10 e 20 cm) apresentaram os maiores valores de riqueza para os três ambientes, que foi diminuindo com o aumento da profundidade, dados que confirmam uma maior diversidade nas primeiras camadas de solo, como descrito anteriormente por Tsai et al. (2003). Da mesma forma que aconteceu com a riqueza, o número de UTO's únicas em cada ambiente foi maior nos ambientes com maior riqueza, sendo que na floresta 26,1% (*MspI*) e 16,8% (*HhaI*) das UTO's encontradas foram exclusivas; no mangue, 20,6% (*MspI*) e 23,6% (*HhaI*) foram exclusivas; e na restinga 11,4% (*MspI*) e 10,8% (*HhaI*) foram exclusivas para esse ambiente. Interessante notar que o número de UTO's comuns aos três ambientes foi de 97 (*MspI*) e 103 (*HhaI*), revelando o efeito transicional desses três ambientes, sendo este valor maior que o valor de UTO's únicas. Também é importante ressaltar que o ambiente de mangue compartilha mais UTO's com o ambiente de floresta do que com o ambiente de restinga. Os resultados de ambas endonucleases foram muito semelhantes, evidenciando confiabilidade nos dados.

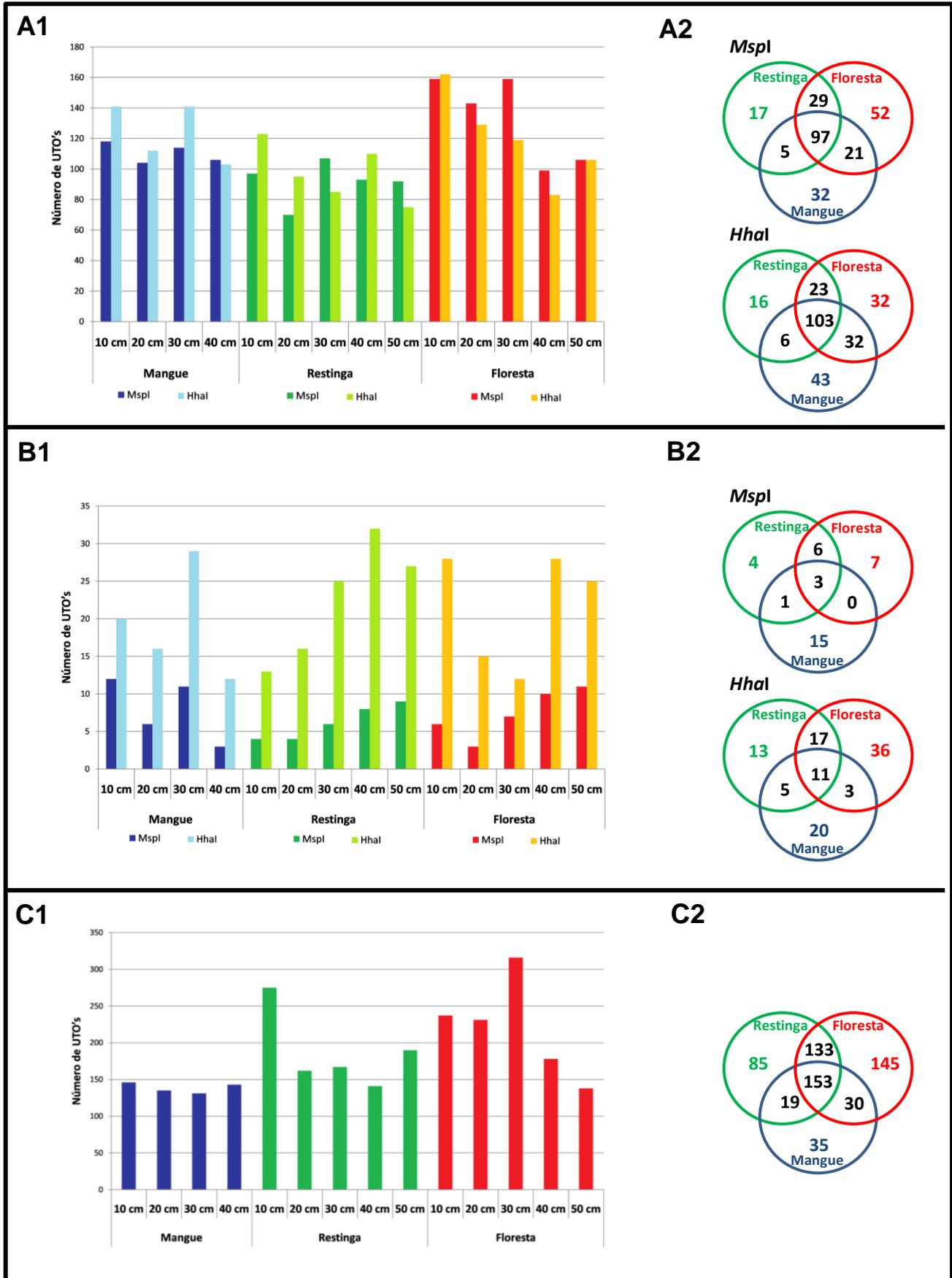


Figura 2.12 - Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO's) detectadas com as técnicas de T-RFLP [(A1) *Bacteria* e (B1) *Archaea*] e ARISA [(C1) *Fungi*]. Diagramas de Venn baseado nas UTO's para os grupos *Bacteria* (A2), *Archaea* (B2) e *Fungi* (C2).

Para as comunidades de *Archaea*, a riqueza de UTO's foi muito menor quando comparado com a riqueza das comunidades de *Bacteria*. A riqueza entre os ambientes não foram muito discrepantes entre si, sendo que a floresta apresentou uma riqueza um pouco maior que os ambientes de restinga e mangue. Para as comunidades de *Archaea*, a maior riqueza se encontra nas maiores profundidades (30 e 40 cm), diferente do que ocorreu para o grupo *Bacteria* e *Fungi*, os quais apresentaram maior riqueza nas primeiras profundidades. Para a endonuclease *HhaI*, o número de UTO's na floresta variou de 12 a 28; na restinga de 32 a 25; e no mangue de 29 a 12. A riqueza de UTO's apresentou grande diferença entre as endonucleases utilizadas, sendo que *HhaI* apresentou um maior número quando comparada com *MspI*. Nas comunidades de *Archaea*, o número de UTO's únicas foi maior do que o número de compartilhadas entre os ambientes, revelando um efeito de seleção das comunidades desse grupo em cada ambiente. Na floresta, 43,7% (*MspI*) e 53,7% (*HhaI*) das UTO's encontradas foram exclusivas desse ambiente; para as amostras de restinga, 28,5% (*MspI*) e 28,2% (*HhaI*) foram exclusivas; e no mangue, 78,9% (*MspI*) e 51,28% (*HhaI*). Apenas a restinga apresentou uma baixa porcentagem de UTO's únicas, enquanto em mangue e floresta esse número foi maior que a metade das UTO's encontradas.

Para as comunidades de *Fungi*, a riqueza foi aumentando no sentido mangue-restinga-floresta, sendo o mangue o ambiente que apresentou menor riqueza de UTO's. O número de UTO's de mangue variou entre 131 a 146; na restinga variou entre 141 a 275; e na floresta variou entre 138 a 316. Como aconteceu para as comunidades de *Bacteria*, a riqueza foi maior nas primeiras profundidades amostradas, como já foi descrito por Tsai et al. (2003). O número de UTO's únicas para a floresta foi de 145, para a restinga 85, e 35 para o mangue. Como aconteceu com as comunidades de *Bacteria*, o número de UTO's comuns aos três ambientes foi bastante significativa, apresentando um valor de 153, revelando um compartilhamento de espécies entre os ambientes, evidenciando a transição que é observada na paisagem natural. Neste caso também foi observado que o manguezal compartilha mais UTO's com a floresta do que com a restinga.

De acordo com os dados, a riqueza de UTO's dos grupos de *Bacteria* e *Fungi* foram maiores quando comparada com a riqueza de *Archaea* nos três ambientes estudados. Como para *Bacteria* e *Fungi*, membros do domínio *Archaea* ocorrem globalmente, e não somente naqueles ambientes considerados extremos (DeLONG, 1992; ZHANG et al., 2005; TESKE, 2006). Em estudo comparativo foi mostrado que, para a maioria dos ambientes, a diversidade de membros do domínio *Archaea* tende a ser relativamente menor do que a diversidade de

membro do domínio *Bacteria*, dados que corroboram os resultados obtidos nessa pesquisa (ALLER; KEMP, 2008).

Supõe-se que essa diferença entre a diversidade dos grupos seja devido ao uso do ambiente por estes, que é mais restrito para *Archaea* do que para *Bacteria*. Membros do domínio *Archaea* podem viver em micro-nichos enquanto bactérias vivem mais amplamente ou em diferentes micro-nichos (ALLER; KEMP, 2008). A diferença na riqueza de *Archaea* foi menor no manguezal, por este ser um ambiente propício para a sobrevivência desse grupo, por se tratar de um ambiente considerado extremo. O solo de manguezal é composto basicamente por matéria orgânica misturada com sedimento, sendo anaeróbico, exceto para os sedimentos de superfície (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). Os ambientes de manguezais estão sob forte influência de ciclos de inundação de marés, apresentando grandes variações de potencial de oxi-redução. Ao longo de um perfil de solo variando de óxido para anóxico, diferentes processos biogeoquímicos podem alterar a forma como a matéria orgânica é utilizada pelos microrganismos, alterando assim as estruturas das comunidades microbianas (CURY, 2006). Alongi et al. (1998), estudaram três manguezais na península da Malásia e constataram que as florestas mais jovens sofrem maior impacto quanto às condições aeróbias e anaeróbias do sedimento. Visto que a vegetação influencia as comunidades microbianas, o ambiente de manguezal possui características muito diferentes dos ambientes de floresta e restinga, as quais são responsáveis pelas diferenças estruturais que apresentaram as comunidades microbianas estudadas.

Para os grupos de *Bacteria* e *Fungi* a riqueza de UTO's foi maior nas primeiras profundidades (até 20 cm) enquanto que para o grupo de *Archaea*, a riqueza foi maior nas amostragens mais profundas (30 a 50 cm), evidenciando um gradiente de seleção dos grupos microbianos em função da profundidade. Essas diferenças podem estar relacionadas à baixa capacidade dos microrganismos do domínio *Bacteria* e *Fungi* de se adaptarem a ambientes anóxicos, ao contrario dos microrganismos do domínio *Archaea* (OVREAS et al., 1997).

A riqueza de UTO's das comunidades de *Archaea* no manguezal não foi discrepante quando comparada com a riqueza nos ambientes de floresta e restinga, o que sugere que a diversidade de *Archaea* em manguezais é relativamente alta. Dados semelhantes foram encontrados por Yan, Hong e Yu (2006), onde foram construídas bibliotecas do gene 16S rRNA de solos de manguezal e pôde-se constatar uma alta diversidade nesses ambientes.

Para as comunidades de *Fungi*, a riqueza de UTO's no manguezal foi bem menor da encontrada para os ambientes de restinga e floresta. Porém, os fungos desempenham papel fundamental no ciclo de nutrientes desses ambientes (HYDE et al., 1995). Pouco se conhece sobre a fisiologia e a bioquímica de fungos nos ambientes de manguezais, apesar de a maior parte desses organismos produzirem compostos de interesse biotecnológico (KATHIRESAN; BINGHAN, 2001).

Analisando, de forma geral, a riqueza de UTO's nos ambientes de manguezal, floresta e restinga, pode-se notar que as diferenças nas estruturas das comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* são devido ao ambiente amostrado e também em função da profundidade (CURY, 2006; NUNES, 2006).

O ecossistema de manguezal, apesar de possuir uma menor diversidade de plantas e outros organismos quando comparados com a floresta e a restinga, apresenta uma alta diversidade microbiana, que por sua vez possui papel fundamental na manutenção e equilíbrio desses ecossistemas.

2.3 Conclusão

O emprego das técnicas de T-RFLP e ARISA revelou diferenças estruturais na composição das comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* que ocorrem nos solos na sucessão manguezal-restinga-floresta. A metodologia utilizada foi sensível ao detectar as diferenças e o padrão de distribuição dos microrganismos de forma semelhante ao observado no ambiente natural. Considerando o fato de que foram caracterizados os perfis das comunidades microbianas no manguezal e ambientes adjacentes, e foram acessados representantes dos três Domínios microbianos, permitindo a comparação da diversidade microbiana em três ambientes, os resultados deste trabalho confirmam e estendem estudos anteriores revelando a grande diversidade microbiana no ambiente de manguezal sugerindo que estas comunidades microbianas desempenham papel fundamental no equilíbrio do ecossistema.

Os resultados desta pesquisa visam contribuir com o conhecimento da diversidade de microrganismos no solo de manguezal, em comparação com os ambientes de restinga e

floresta, de forma a relevar a importância da preservação dessas áreas e seu possível potencial biotecnológico, por apresentar diversidade e características únicas para esses ecossistemas.

Adicionalmente, os resultados apontam que ferramentas moleculares poderiam ser usadas para monitorar o impacto de ações antrópicas sobre as comunidades microbianas nesses ambientes, de forma a prever os efeitos no ecossistema.

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 a total and extracellular DNA. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 859-868, 2004.
- ALLER, J.Y.; KEMP, P.F. Are Archaea inherently less diverse than Bacteria in the same environments? **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 65, p. 74-87, 2008.
- ALONGI, D.M. The dynamics of benthic nutrient pools and fluxes in tropical mangrove forests. **Journal of Marine Research**, New Haven, v. 54, p. 123-148, 1996.
- ALONGI, D.M.; SEKUMAR, A.; TIRENDI, F.; DIXON, P. The influence of stand age on benthic decomposition and recycling of organic matter in managed mangrove forests of Malaysia. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 225, p. 197-218, 1998.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143-169, 1995.
- BERNARDI, J.V.E.; LANDIM, P.M.B.; BARRETO, C.L.; MONTEIRO, R.C. Spatial study of the vegetation gradient from Cardoso Island State Park, SP, Brazil. **Holos Environment**, Rio Claro, v. 5, n. 1, p. 1-22, 2005.
- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial populations shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 2647-2653, 1997.
- BRAKER, G.; AYALA-DEL-RIO, H.L.; DEVOL, A.H.; FESEFELDT, A.; TIEDJE, J.M. Community structure of denitrifiers, *Bacteria* and *Archaea* along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 1893-1901, 2001.
- BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: Atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, New York, v. 36, p. 214-216, 2004.
- CANNAVAN, F.S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CLARKE, K.R. Nonparametric multivariate analyses of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, Carlton, v. 18, p. 117-143, 1993.

CLEMENT, B.G.; KEHL, L.E.; DEBORD, K.L.; KITTS, C.L. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 31, p. 135-142, 1998.

CULMAN, S.W.; GAUCH, H.G.; BLACKWOOD, C.B.; THIES, J.E. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, p. 55-63, 2008.

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

CURY, J.C. **Diversidade de *Bacteria* e *Archaea* em solos de mangue e marisma**. 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

DANOVARO, R.; LUNA, G.M.; DELL’ANNO, A.; PIETRANGELI, B. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 5982-5989, 2006.

DELONG, E.F. Archaea in coastal marine environments. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 89, p. 5685-5689, 1992.

DIAS, A.C.F. **Diversidade de bactérias do sedimento de manguezal da Ilha do Cardoso Cananéia – São Paulo**. 2008. 61 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DUNBAR, J.; TICKNOR, L.O.; KUSKE, C.R. Phylogenetic specificity and reproducibility and a new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 190-197, 2001.

EDEL-HERMANN, V.; DREUMONT, C.; PÉREZ-PIQUERES, A.; STEINBERG, C. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal RNA genes to assess changes in fungal community structure in soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 47, p. 397-404, 2004.

FAUTH, J.E.; BERNARDO, J.; CAMARA, M.; RESETARITS Jr., W.J.; VAN BUSKIRK, J.; McCOLLUM, S.A. Simplifying the jargón of community ecology: a conceptual approach. **The American Naturalist**, Chicago, v. 147, n. 2, p. 282-286, 1996.

FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 103, n. 3, p. 626-631, 2006.

FISHER, M.M.; TRIPLETT, E.W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 4630-4636, 1999.

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. cap. 3, p. 65-113.

HARTMANN, M.; FREY, B.; KOLLIKER, R.; WIDMER, F. Semi-automated genetic analysis of soil microbial communities: comparison of T-RFLP and RISA based on descriptive and discriminative statistical approaches. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 61, p. 349-360, 2005.

HITZL, W.; HENRICH, M.; KESSEL, M.; INSAM, H. Application of multivariate analysis of variance and related techniques in soil studies with substrate utilization tests. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 30, p. 81-89, 1997.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems; an overview. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 33, p. 265-278, 2001.

HYDE, K.D. *Lophiostoma asiana* sp. Nov. from Thailand mangroves. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 55, p. 283-288, 1995.

JESUS, E.C.; MARSH, T.L.; TIEDJE, J.M.; MOREIRA, F.M.S. Changes in land use alter structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, Heteren, p. 1-8, May 2009.

KATHIRESAN, K.; BINGHAN, B.L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, San Diego, v. 40, p. 81-251, 2001.

LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E.D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. **Oecologia**, New York, v. 129, p. 271-280, 2001.

LeHOURS, A.C.; BARDOT, C.; THENOT, A.; DEBROAS, D.; FONTY, G. Anaerobic microbial communities in Lake Pavin, a unique meromictic lake in France. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 7389-7200, 2005.

MARSH, T.L.; SAXMAN, P.; COLE, J.; TIEDJE, J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3616-3620, 2000.

MEDAU, R. **Diversidade de bactérias *Burkholderia* em solo de Terra Preta Arqueológica da Amazônia por análise em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) e seqüenciamento**. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MELO, M.R.F.; MANTOVANI, W. Composição florística e estrutura fitossociológica da mata atlântica de encosta na Ilha do Cardoso (Cananéia, Brasil). **Boletim do Instituto de Botânica**, São Paulo, v. 9, p. 107-158, 1994.

MIDDELBURG, J.J.; NIEUWENHUIZE, J.; SLIM, F.J.; OHOWA, B. Sediment biogeochemistry in na East African mangrove Forest (Gazi Bay, Kenya). **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 34, n. 3, p. 133-155, 1996.

MOESENEDER, M.M.; WINTER, C.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) screening of a marine archaeal clone library to determine the different phylotypes. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 44, p. 159-172, 2001.

NEGREIROS, D. et al. Planos de manejo para o Parque Estadual da Ilha do Cardoso. **Boletim Técnico do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 9, p. 1-56, 1974.

NUNES, G.L. **Diversidade e estrutura de comunidades de *Bacteria* e *Archaea* em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

OVREAS, 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.

PERES-NETO, P.R.; LEGENDRE, P.; DRAY, S.; BORCARD, D. Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. **Ecology**, Washington, v. 87, p. 2614-2625, 2006.

PEZESHKI, S.R.; DELAUNE, R.D.; MEEDER, J.F. Carbon assimilation and biomass partitioning in *Avicennia germinas* and *Rhizophora mangle* seedlings in response to soil redox conditions. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 37, n. 2-3, p. 161-171, 1997.

PIELOU, E.C. **The interpretation of ecological data** – a primer on classification and ordination. New York: John Wiley & Sons, 2000. 263 p.

POOL, D.J.; LUGO, A.E.; SNEDAKER, S.C. Litter production in mangrove forests of Southern Florida and Puerto Rico. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGY AND MANAGEMENT OF MANGROVES, 1975, Gainesville. **Proceedings...** Gainesville: Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida, 1975. v. 1, p. 213-237.

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 62, p. 142-160, 2007.

RANJARD, L.; POLY, F.; LATA, J.C.; MOUGUEL, C.; THIOLOUSE, J.; NAZARET, S. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4479-4487, 2001.

RONNBACK, P. The ecological basis for economic value of seafood production supported by mangrove ecosystems. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 29, p. 235-252, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

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

SEQUERRA, J.; MARMEISSE, R.; VALLA, G.; NORMAND P.; CAPELLANO, A.; MOIROUD, A. Taxonomic position and intraspecific variability of the nodule forming *Penicillium nodositatum* inferred from RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer and random amplified polymorphic DNA. **Mycological Research**, New York, v. 101, p. 465–472, 1997.

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.

TESKE, A.P. Microbial communities of deep marine subsurface sediments: molecular and cultivation surveys. **Geomicrobiology Journal**, Philadelphia, v. 23, p. 357-386, 2006.

THIES, J.E. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 71, p. 579-591, 2007.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 3, p. 782-787, 1990.

TSAI, S.M.; CANNAVAN, F.S.; SILVA JUNIOR, J.P.; CHAVES, M.G.; PASSIANOTO, C.C.; BORGES, C.P. Diversidade bacteriana em terra preta de índio baseada em seqüenciamento do gene 16S rRNA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: SBCS, 2003. 1 CD-ROM.

WOODWELL, G.M.; WHITNEY, D.E.; HALL, C.A.S.; HOUGHTON, R.A. The flax pond ecosystem study: Ex changes of carbon in water between a salt marsh an long island sound. **Limnology and Oceanography**, Grafton, v. 22, n. 5, p. 833-938, 1977.

XU, J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 1713-1731, 2006.

YAN, B.; HONG, K.; YU, Z.N. Archaeal communities in mangrove soil characterized by 16S rRNA gene clones. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 44, n. 5, p. 566-571, 2006.

YANNARELL, A.C.; TRIPLETT, E.W. Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 214-223, 2004.

ZHANG, G.; DONG, H.; XU, Z.; ZHAO, D.; ZHANG, C. Microbial diversity in ultra-high-pressure rocks and fluids from the Chinese Continental Scientific Drilling Project in China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 3213-3227, 2005.

3 ESTRUTURAS E DIVERSIDADE DE COMUNIDADES MICROBIANAS EM SOLO DE MANGUEZAL PRESERVADO E ANTROPIZADO

Resumo

Os manguezais são considerados ecossistemas altamente produtivos, provendo uma grande quantidade de nutrientes aos ambientes adjacentes, desempenhando um importante papel na manutenção da vida marinha. Embora os manguezais sejam considerados áreas de proteção ambiental, a destruição desses ecossistemas é progressiva, devido às atividades industriais e portuárias nos estuários. Este estudo avaliou o efeito da ação antropogênica sobre as estruturas e diversidade das comunidades microbianas em solo de manguezal. Amostras foram coletadas de 0 a 40 cm de profundidade em um manguezal preservado e outro antropizado, na Ilha do Cardoso-SP. O DNA genômico foi extraído das amostras e reações de PCR foram realizadas com *primers* específicos para os grupos de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi*; os *amplicons* foram analisados pelas técnicas de T-RFLP e ARISA; adicionalmente foi construída uma biblioteca genômica 16S rRNA de *Archaea* para avaliar os grupos presentes em cada manguezal. Através de análises estatísticas dos dados foi possível revelar que a ação antropogênica tem efeito sobre as comunidades microbianas alterando suas estruturas e causando perda de diversidade, e essa variação está relacionada com as alterações dos atributos físico-químicos do solo. A análise da biblioteca de clones 16S rRNA de *Archaea* mostrou que essas comunidades apresentaram variação em função da profundidade amostrada, onde na camada mais superficial estão presentes membros do filo *Euryarchaeota*, enquanto nas camadas mais profundas estão os membros do filo *Crenarchaeota*; também foi possível notar a presença de clones exclusivos em cada ambiente. Este trabalho mostra a importância da preservação dos ambientes de manguezais, evidenciando os efeitos causados por ações antropogênicas de poluição e desmatamento, e destacando a alta diversidade de microrganismos e seu possível potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Ecologia microbiana; Manguezais; T-RFLP; ARISA; Biblioteca genômica; gene 16S rRNA.

3 STRUCUTRES AND DIVERSITY OF MICROBIAL COMMUNITIES IN SOIL OF PRESERVED AND ATHROPIZED MANGROVE

Abstract

Mangroves are considered ecosystems highly productive, providing a great amount of nutrients to the adjacent environments, playing an important role in the maintenance of the sea life. Although the mangroves are considered areas of environmental protection, the destruction of those ecosystems is progressive, due to industrial and port activities in the estuaries. This study evaluated the effect of the anthropogenic action over the microbial communities in mangroves soil. Samples were collected from 0 to 40 cm of depth in a preserved and anthropized mangrove, in the Ilha do Cardoso-SP. The genomic DNA was extracted of the samples and PCR reactions were accomplished with specific primers for the groups of *Bacteria*, *Archaea* and *Fungi*; the amplicons were analyzed by the T-RFLP and ARISA techniques; additionally a genomic library 16S rRNA gene of *Archaea* was built to evaluate the present groups in each mangrove. Through statistical analyses of the data it was possible to reveal that the anthropogenic action has effect over the microbial communities altering their structures and causing diversity loss, and that variation is related with the alterations on the physiochemical soil attributes. The analysis of the clone library 16S rRNA gene of *Archaea* showed that those communities presented variation in function of the depth, where, in the superficial layer, are present members of the phylum *Euryarchaeota*, while in the deepest layers are the members of the phylum *Crenarchaeota*; it was also possible to notice the presence of exclusive clones in each environment. This work shows the importance of the preservation of the mangroves ecosystems, evidencing the effects caused by anthropogenic actions like pollution and deforestation, and detaching the high diversity of microorganisms and its possible biotechnological potential.

Keywords: Microbial Ecology; Mangroves; T-RFLP; ARISA; Genomic library; 16S rRNA gene

3.1 Introdução

"Sempre que reflito sobre a belíssima ordem que observamos o mundo, como cada coisa se origina da outra, sinto-me como se estivesse lendo um texto divino, escrito não com letras mas com objetos, que dissesse: Homem, amplia a tua razão, para que possas compreender".

(Johannes Kepler | 1571 – 1630)

Os ecossistemas de manguezais cobrem aproximadamente 60-75% da linha costeira tropical e subtropical do mundo. O Brasil, a Indonésia e a Austrália possuem as maiores áreas de manguezais do mundo (AKSORNKOAE et al., 1984). Os manguezais são considerados ecossistemas altamente produtivos, provendo uma grande quantidade de nutrientes aos ambientes adjacentes, desempenhando um papel importante na manutenção da vida marinha; servem também como abrigo, fonte de alimento e berçário para crustáceos, moluscos, peixes de importância comercial, e aves residentes e migratórias (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

Embora os manguezais sejam considerados áreas de proteção ambiental, a destruição sistemática desses ambientes tem aumentado, devido a atividades industriais e portuárias nos estuários (CURY, 2002). Nesses ambientes, a ciclagem de nutrientes está diretamente relacionada às atividades e a diversidade das comunidades microbianas presentes no solo. A ação antrópica, por meio de poluentes e desmatamento, pode alterar as estruturas das comunidades de microrganismos, causando desequilíbrios ecológicos que podem levar à extinção de espécies importantes para a manutenção do ecossistema. Em última instância, esse processo pode resultar em diminuição da ciclagem de nutrientes e alterar o crescimento de espécies vegetais.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo comparar as estruturas das comunidades microbianas presentes em solo de manguezal preservado e antropizado. Foi realizado levantamento das comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* por meio das análises de T-RFLP e ARISA. Num segundo momento, foi realizada a construção de bibliotecas do gene 16S rRNA de *Archaea*, a fim de se conhecer os principais organismos residentes nos dois ambientes e avaliar o efeito da ação antropogênica sobre a diversidade microbiana em manguezais, destacando, assim, a importância da preservação desses ambientes.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, CENA/USP, Piracicaba-SP. Uma representação explicativa das etapas do trabalho pode ser visualizada na Figura 3.1.

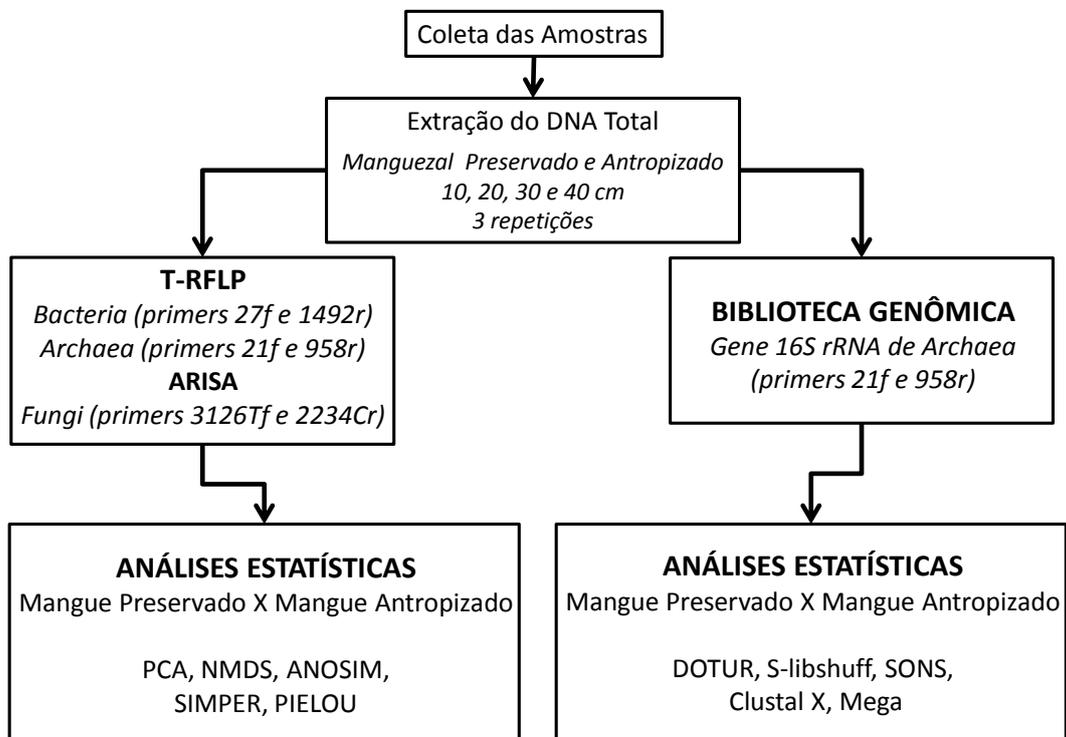


Figura 3.1 – Diagrama explicativo das etapas realizadas no trabalho.

3.2.1.1 Área de Estudo

Amostras de solo de mangue preservado e antropizado foram coletadas no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (ver capítulo 2 item 2.2.1).

3.2.1.2 Amostragem dos Solos

Amostras de solo foram coletadas em pontos demarcados em solos de mangue preservado e mangue antropizado. Foram coletados seis pontos, sendo três pontos de mangue preservado e três de mangue antropizado (Figura 3.2).



Figura 3.2 - Foto da área de coleta no Parque Estadual da Ilha do Cardoso. Os pontos em vermelho indicam o local de coleta das amostras de manguezal preservado e antropizado (fonte: Google Earth). Coordenadas Geográficas: Manguezal preservado 25°05'6,8"S e 47°57'41,4"W, e manguezal antropizado (região do núcleo Perequê 25°03'54,5"S e 47°55'02,8"W).

As amostras de mangue preservado foram coletadas ao longo do gradiente de inundação do manguezal numa região sem histórico de ação humana (mesmas amostras utilizadas no Capítulo 2). As amostras de mangue antropizado foram coletadas no núcleo Perequê, em ambiente com ação antrópica.

De acordo com o Atlas de Sensibilidade ambiental do Parque, elaborado por Wieczorek (2006), a região onde foram coletadas as amostras de manguezal preservado sofre pouca influência antropogênica, com a presença de poucas casas e atividades de pesca artesanal. A região do manguezal antropizado está localizada no Núcleo Perequê, um local com forte influência antropogênica, onde nota-se a presença de muitas casas, locais públicos, trilhas,

áreas desflorestadas, campings, bares, áreas praianas com acesso a turistas, como também a presença de embarcações e atividade de pesca artesanal e esportiva; essa é uma região por um intenso tráfego de pessoas devido ao turismo local. Vela lembrar que, de acordo com o Ministério do Meio Ambiente, as áreas de manguezais são consideradas os ecossistemas mais sensíveis a derramamento de óleo, apresentando Índice de Sensibilidade (ISL) de valor 10, o valor máximo de sensibilidade (BRASIL, 2004). Neste contexto, os dois manguezais amostrados apresentam diferentes históricos de preservação, possibilitando a comparação e o estudo do efeito antropogênico nas comunidades microbianas nos dois ambientes. A Figura 3.3 resume as ações antrópicas presentes em cada ambiente.



Figura 3.3 - Quadro resumindo a ação antropogênica nos dois manguezais estudados (modificado de Wieczorek, 2006).

Foram utilizados tubos de PVC previamente esterilizados, de 50 cm de comprimento por 50 mm de diâmetro, sendo introduzidos de forma vertical no sedimento. Após a coleta, as amostras (aproximadamente 400 g por tubo) foram armazenadas e mantidas sob baixa temperatura (4°C) em caixas térmicas com gelo e enviadas imediatamente para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP), a fim de iniciar as análises moleculares.

Uma alíquota das amostras foi armazenada em UltraFreezer (Thermo Forma, Forma Scientific) a -80°C para a extração do DNA genômico utilizados nas análises moleculares; outra alíquota foi enviada para o Laboratório de Análises Químicas do Departamento de

Ciência do Solo, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), para a análise das propriedades físico-químicas.

3.2.1.3 Extração de DNA Genômico do solo e Análises de T-RFLP e ARISA

Os passos de extração do DNA genômico total do solo, as reações de amplificação de regiões do DNA, a purificação e a análise dos dados de T-RFLP e ARISA seguiram os mesmos padrões descritos no capítulo 2 (ver seções de 2.2.1.3 a 2.2.1.12).

3.2.1.4 Biblioteca 16S rRNA de *Archaea*

3.2.1.4.1 Amplificação do gene 16S rRNA de *Archaea*

Para as reações de amplificação do gene 16S rRNA de *Archaea*, foram utilizados os *primers* ARCH21f (5' TTC YGG TTG ATC CYG CCI GA 3') e ARCH958r (5' YCC GGC GTT GA(I/C) TCC AAT T 3') (DELONG et al., 1992). A amplificação foi feita em solução contendo: 2,5 µl de tampão para PCR 10X; 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,5 µl de dNTP 10 mM; 0,25 µl de BSA 1 ng.µl⁻¹; 0,2 µl de Platinum[®] Taq Polimerase 5 U (Invitrogen); 1 µl de cada *primer*; 1 µl da amostra de DNA total de solo; e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para volume final de 25 µl. As reações foram realizadas em triplicata para as profundidades de 10 e 40 cm dos mangues preservado e antropizado. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 1 min; e 72°C por 10 min. Uma alíquota de 5 µl do produto de amplificação foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2 µl de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e então foto documentado.

3.2.1.4.2 Purificação dos Produtos de PCR

Para a purificação dos produtos de PCR, as triplicatas foram misturadas para a obtenção de uma amostra composta de cada manguezal (preservado e antropizado) em cada profundidade (10 e 40 cm). Na purificação foi utilizado o Kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Adicionou-se ao produto de PCR 100 µl de *Capture buffer type 2* e a mistura foi transferida para uma coluna GFX (com filtro), sendo centrifugada a 16.000 x g por 30 s. O filtrado que passou pela coluna foi descartado. Na coluna GFX adicionou-se 500 µl de *Wash buffer type 1* e centrifugou-se a 16.000 x g por 30 s, descartando o filtrado. A coluna foi transferida para um novo microtubo e, para a eluição do DNA, foi adicionado 20 µl do *Elution buffer type 4* no centro da membrana. Incubou-se a mistura por 1 min à temperatura ambiente e centrifugou-se a 16.000 x g por 1 min para recolher o DNA purificado. Uma alíquota de 5 µl do DNA purificado foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2 µl de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e posteriormente foto documentado. O produto purificado foi armazenado a -20 °C até posterior utilização.

3.2.1.4.3 Clonagem dos Produtos de PCR

O produto amplificado e purificado da PCR do gene 16S rRNA de *Archaea*, dos manguezais preservado e antropizado, foi clonado em vetor *pGEM[®]-T Easy*, de acordo com as instruções do fabricante do Kit *pGEM[®]-T Easy Vector* (Promega). A reação de ligação do produto de PCR purificado ao vetor foi realizada da seguinte maneira: 1 µl de T4 DNA Ligase (3U/µl); 5 µl de tampão T4 Ligase 1X; aproximadamente 100 ng do produto de PCR purificado e 54 ng do vetor pGEM[®]-T. A quantidade necessária em ng do produto de PCR a ser utilizado na clonagem foi realizada considerando a fórmula abaixo (1).

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{tamanho do inserto (Kb)}}{\text{Tamanho do vetor (Kb)}} \times \text{taxa molar inserto : vetor} \quad (1)$$

A taxa molar inserto:vetor utilizada foi de 3:1. A reação foi incubada a 4°C overnight para a obtenção de uma maior eficiência de ligação.

3.2.1.4.4 Preparo das Células Competentes de *Escherichia coli*

Células competentes de *E. coli* DH5 α foram preparadas quimicamente utilizando o método de Cloreto de Cálcio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989). Células de uma colônia isolada de *E. coli*, crescidas anteriormente em placa de Petri contendo meio Luria Bertani – LB (1% de Triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,25% de NaCl; 4% de agar), foram inoculadas em 10 ml de meio LB líquido, o qual foi incubado a 37°C por 16 h, sob agitação constante de 200 rpm (New Brunswick Scientific – C24 Incubator Shaker, Edison NJ, USA). Após o crescimento da cultura, 100 μ l foi adicionado a 25 ml de meio LB líquido para a reinoculação, mantendo-se o frasco incubado a 37°C por aproximadamente 4 h, sob agitação constante de 200 rpm, até atingir uma absorbância de 0,5 a 600 nm. As células foram transferidas para tubo de 50 ml e incubadas no gelo por 10 m. O tubo foi centrifugado a 3500 rpm, por 15 min a 15°C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1/2 volume de uma solução gelada e esterilizada de CaCl₂/Glicerol (50 mM de CaCl₂ e 10% de glicerol). As células foram incubadas no gelo por 15 min e centrifugadas a 3500 rpm, por 15 min a 15°C. As células foram gentilmente ressuspensas em 1/5 do volume da solução gelada de CaCl₂/Glicerol. Alíquotas de 100 μ l foram transferidas para microtubos e armazenadas a -80°C.

3.2.1.4.5 Transformação de *E. coli*

A eficiência de transformação das células foi medida usando protocolo de transformação através de choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989) com plasmídeo comercial *pGEM T-Easy* de concentração conhecida. A eficiência foi estimada em 10⁸ transformantes por μ g de DNA.

O vetor contendo o inserto foi inserido em células competentes de *E. coli* DH5 α através de choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989). O processo de transformação foi realizado da seguinte maneira: 2 μ l do produto de ligação e 50 μ l de células competentes foi adicionado em microtubo, sendo misturados gentilmente e incubados no gelo por 30 min. Em seguida, o microtubo foi incubado a 42°C em banho-maria por 50 s e novamente incubado em gelo por mais 2 min. Foi adicionado 450 μ l de meio SOC (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989) à temperatura ambiente e incubado por 2 h a 37°C, sob agitação de 200 rpm.

As células competentes transformadas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio LB sólido, acrescido de ampicilina, X-Gal e IPTG (todos em concentração final de 100 μ g.ml⁻¹). A cultura com as células foi incubada em estufa a 37°C por 16 h e, após este período, as placas foram armazenadas a 4°C para facilitar a visualização e a seleção das colônias azuis/brancas.

3.2.1.4.6 Seleção dos Clones e Extração do DNA

Apenas as colônias brancas, as quais devem conter vetor/inserto, foram selecionadas para a continuação do trabalho. As colônias foram coletadas com auxílio de palitos estéreis e transferidas para microplaca 96-well, contendo 50 μ l de TE (Tris 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH8). Para a extração do DNA das células em suspensão, a placa foi submetida a 95°C por 10 min em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). As placas contendo o DNA extraído foi mantida a -20°C até posterior utilização.

3.2.1.4.7 PCR de Inserto e Purificação

Para as reações de amplificação da região do vetor contendo o inserto do gene 16S rRNA de *Archaea*, foram utilizados os *primers* M13f (5' GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A 3') e M13r (5' GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAG G 3') (HUEY; HALL, 1989). A amplificação foi feita em solução contendo: 3,0 μ l de tampão para PCR 10X; 1,8 μ l de MgCl₂ 50 mM; 0,6 μ l de dNTP 10 mM; 0,15 μ l de Platinum[®] Taq Polimerase 5 U (Invitrogen); 1,2 μ l de cada *primer*; 1 μ l da amostra de DNA extraído das colônias; e água

ultrapura (Milli-Q) esterilizada para volume final de 30 µl. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, 52°C por 30 s e 72°C por 1 min; e 72°C por 10 min. Uma alíquota de 5 µl do produto de amplificação foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2 µl de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e posteriormente foto documentado.

Após a verificação da amplificação, os produtos de PCR foram purificados adicionando 3 partes de Isopropanol 100% e 1 parte de água ultrapura (Milli-Q) esterilizada ao produto. A mistura foi agitada levemente no vortex e incubado a -20°C *overnight*. Após o tempo de incubação, centrifugou-se a mistura a 4000 rpm por 90 min, à temperatura ambiente (Centrífuga modelo 5804R, Eppendorf). O sobrenadante foi removido e a placa foi centrifugada invertida, sob papel absorvente, a 900 rpm por 30 s. Foi adicionado 150 µl de etanol 70% e centrifugou-se a 4.000 rpm, por 90 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e a placa foi centrifugada invertida, sob papel absorvente, a 900 rpm por 30 s. As amostras foram secas em termociclador a 40°C por 10 min e ressuspensas em água ultrapura (Milli-Q) esterilizada.

3.2.1.4.8 PCR de Seqüenciamento e Precipitação

Após a amplificação da região do inserto foi realizada a reação de seqüenciamento em microplaca 96-well, utilizando o Kit *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham, GE Bioscience) e o *primer* ARCH21f (5' TTC YGG TTG ATC CYG CCI GA 3') (DELONG et al., 1992). A amplificação foi feita em solução contendo: 2,0 µl de DYEnamic; 4,0 µl de tampão para PCR 2,5X (400 mM Tris-HCl pH 9,0; 10 mM MgCl₂); 1,0 µl do *primer* a 5 pmol; 1 µl do produto de amplificação da região do inserto; e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para volume final de 10 µl. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 30 ciclos com desnaturação de 95°C por 20 s, anelamento a 53°C por 15 s e extensão a 60°C por 1 min.

Após a reação, as amostras foram precipitadas para o seqüenciamento conforme instrução do fabricante. Adicionou-se 2 µl de solução Acetato de Sódio/EDTA e 60 µl de etanol absoluto. O material foi misturado em vortex e centrifugado a 4.000 rpm, por 45 min à temperatura ambiente (Centrifuga modelo 5804R, Eppendorf). O sobrenadante foi removido e a placa foi centrifugada invertida, sob papel absorvente, a 900 rpm por 30 s. Foi adicionado 150 µl de etanol 70% e centrifugou-se a 4.000 rpm, por 15 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e a placa foi centrifugada invertida, sob papel absorvente, a 900 rpm por 30 s. As amostras foram secas em termociclador a 40°C por 10 min.

As amostras foram ressuspendidas em 10 µl de Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) e o seqüenciamento dos clones foi realizado no seqüenciador capilar automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.2.1.4.9 Análise das Seqüências

A verificação das seqüências foi realizada com base nos eletroferogramas gerados pelo software *Sequencing Analysis* 3.0. As seqüências parciais brutas foram analisadas no site *Ribosomal Database Project II* (RDP II) versão 10 (<http://rdp.cme.msu.edu/>), para edição e remoção de seqüências com baixa qualidade (COLE et al., 2009). O nível de exigência mínima foi de 350 bases com qualidade Phrap acima de 20 (1 erro a cada 100 bases lidas), para posteriores análises. O RDP possui um sistema de classificação taxonômica (RDP Hierarchy) que segue a proposta do Manual Bergeys (GARRITY; BELL; LIBURUN, 2004) no qual os principais níveis taxonômicos são: Domínio, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie.

O número de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO's) foi determinado utilizando-se o programa DOTUR (Distance Based OTU and Richness Determination) (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005), considerando-se uma distância evolutiva de 0,03 (97% de similaridade) através do algoritmo de *furthest neighbor*. Para tanto, as seqüências foram alinhadas utilizando o programa Clustal X 2.0 (THOMPSON et al., 1997; LARKIN et al., 2007) e editadas com o programa CLC Sequence Viewer 6.1, disponível gratuitamente no site <http://www.clcbio.com>. O alinhamento foi utilizado para se calcular uma matriz de distância evolutiva através do DNADIST, programa do pacote PHYLIP 3.63, usando o algoritmo de

Jukes e Cantor. O programa DOTUR também foi utilizado para a construção da curva de rarefação.

Um diagrama de Venn foi elaborado para verificar as intersecções e peculiaridades das bibliotecas obtidas. Para se verificar estatisticamente as diferenças entre as bibliotecas foi utilizado o programas S-Libshuff versão 1.22, disponível em (<http://libshuff.mib.uga.edu/>) (SINGLETON et al., 2001).

3.2.2 Resultados e Discussão

3.2.2.1 Coleta e Caracterização dos Solos

Todas as amostras de solo foram coletadas no Parque Estadual da Ilha do Cardoso, em região preservada e antropizada, nas profundidades 10, 20, 30 e 40 cm. Após a coleta, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, onde uma alíquota foi armazenada a -80°C para extração do DNA e futuras análises moleculares; outra alíquota foi enviada ao Laboratório de Análises Químicas da ESALQ/USP para análise das características químicas das amostras de solo (Tabela 3.1). A Análise de Componentes Principais realizada com os dados químicos do solo separaram as amostras em dois grupos distintos, de acordo com o ambiente (Figura 3.4). O manguezal antropizado apresentou maiores concentrações de nutrientes quando comparado com o manguezal preservado. Isso pode ser explicado pelo fato de que uma ação antrópica, com efeito poluidor sobre o manguezal, pode agregar valor em termos de adição de nutrientes para a flora, fauna e também para as comunidades microbianas (WICKRAMASINGHE et al., 2009).

As propriedades do solo possuem um importante papel na nutrição da flora e fauna dos ambientes de manguezais (KATHIRESAN; BINGHAN, 2001). Algumas importantes características são o pH, troca catiônica, condutividade elétrica e o teor de silte (PEZESHKI; DELAUNE; MEEDER, 1997). Porém, o fator mais importante parece ser a concentração de nutrientes, onde, seu fluxo está intimamente relacionado com a assimilação por plantas e a mineralização microbiana (ALONGI, 1996; MIDDELBURG et al., 1996). Como já mencionado, as amostras de manguezal antropizado apresentaram maior teor de nutrientes, fato que pode ter ocorrido devido à ação humana nessa área.

Tabela 3.1 - Caracterização química das amostras dos solos utilizados na pesquisa.

Amostra		pH	M.O.	P	S	K	Ca	Mg
Ambiente	Profundidade	CaCl ₂	g.dm ⁻³	mg.dm ⁻³		mmolc.dm ⁻³		
Mangue Preservado	10 cm	6.3	93	5	-	4.1	14	58
	20 cm	6.4	67	4	-	3.2	8	50
	30 cm	6.3	54	3	-	3.2	18	53
	40 cm	5.9	38	3	-	1.2	10	15
Mangue Antropizado	10 cm	6.4	116	10	-	2.0	42	55
	20 cm	6.7	104	7	174	1.8	44	53
	30 cm	6.4	99.0	6	174	1.8	33	48
	40 cm	6.0	67.0	4	175	1.8	31	43

(-) Resultado <0,1 ou não determinado.

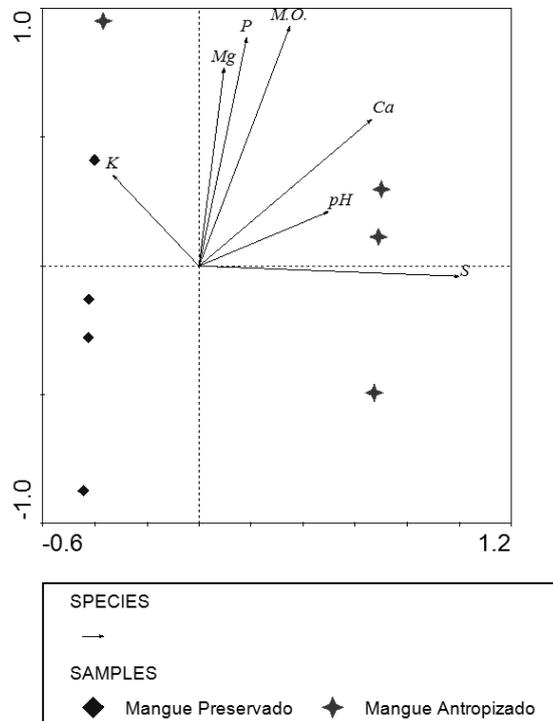


Figura 3.4 - Análise de Componentes Principais baseada nos elementos químicos dos solos de manguezal preservado e antropizado. Os eixos 1 e 2 apresentaram valores de explicabilidade de 89,5% e 9,0% respectivamente.

3.2.2.2 Extração do DNA Genômico Total do Solo

Foram realizadas coletas em dois ambientes de manguezal, um preservado e outro antropizado, a cada 10 cm (de 0 a 40 cm de profundidade), totalizando 12 amostras para cada manguezal e sendo realizado um total de 24 extrações de DNA total de amostras de solo. A

concentração do DNA extraído variou em cada amostra segundo quantificação em espectrômetro, de 40 ng/μl a 300 ng/μl. Testes de amplificação foram previamente realizados com as amostras do DNA extraído e, de maneira geral, todas as amostras apresentaram resultados positivos utilizando uma alíquota de DNA diluída 10X. Portanto, a diluição utilizada na pesquisa foi padronizada.

3.2.2.3 Amplificação e Purificação dos Fragmentos de DNA

Alíquotas do DNA extraído das amostras de solo diluídas 10X apresentaram melhores resultados na amplificação, gerando produtos de PCR suficientes para a continuidade do trabalho. Nas reações de amplificação do gene 16S rRNA do grupo *Bacteria* foram utilizados os *primers* 27f-FAM e 1498r, universais para o grupo, que amplificaram regiões do genoma de tamanho esperado, com aproximadamente 1500 pb. Na amplificação do gene 16S rRNA do grupo *Archaea*, foram utilizados os *primers* 21f-FAM e 958r, amplificando regiões do genoma de tamanho esperado, com aproximadamente 950 pb. Para a amplificação da região do espaço intergênico ribossomal 18S-28S do grupo *Fungi* foram utilizados os *primers* 3126Tf-FAM e 2234Cr, também apresentando resultado ideal para a continuação das análises.

Alguns diferentes fluoróforos têm sido utilizados com sucesso na análise de T-RFLP e ARISA, incluindo HEX, FAM e ROX (THIES, 2007); porém, Ranjard et al. (2001) mostrou que a fluorescência FAM provê uma maior eficiência na PCR, apresentando uma maior intensidade de fluorescência total dos perfis, mas também contribuem para o aumento dos ruídos de fluorescência não-específica, o que pode impedir a detecção de alguns picos. Neste estudo somente os *primers forward* foram marcados com fluorescência FAM, pois estas regiões da subunidade menor do rRNA apresentam maior heterogeneidade (MOESENEDER et al., 2001).

Após a visualização dos resultados da amplificação em gel de agarose 1% as amostras foram purificadas com o Kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). Edel-Hermann et al. (2004) mostraram que a digestão de produtos de PCR não purificados geraram perfis de T-RFLP não consistentes para algumas amostras, nas quais a fluorescência residual de *primers* poderiam interferir na separação correta dos fragmentos terminais de restrição pelo seqüenciador automático.

3.2.2.4 Análise dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) de *Bacteria* e *Archaea*

Após a purificação dos produtos de PCR, as amostras de *Bacteria* e *Archaea* foram submetidas a uma reação de restrição utilizando as endonucleases *MspI* e *HhaI*, gerando fragmentos terminais de restrição (T-RFs). As duas enzimas utilizadas possuem sítios de reconhecimento de quatro pares de bases, o que garantem uma alta frequência de corte. Essas enzimas também são as mais utilizadas em análises de T-RFLP (BLACKWOOD et al., 2003; ENGBRETSON; MOYER, 2003; HAYASHI et al., 2005; HARTMANN; WIDMER, 2006; CHAN et al., 2006 e 2008; LEE et al., 2008). Após a reação de restrição, as amostras foram precipitadas e então carregadas no seqüenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os arquivos gerados foram analisados previamente no programa PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) para a avaliação da qualidade das corridas no seqüenciador e uma matriz foi exportada para o programa Excel (Microsoft), onde as planilhas de dados foram organizadas para a análise nos programas Canoco 4.5 (Biometris, Wageningen, Holanda) e Primer5 (Plymouth Marine Laboratory, Primer-E, Reino Unido). Como já mencionado, os dados de altura dos picos (unidades de fluorescência) foram transformados em dados relativos para minimizar as diferenças da quantidade de DNA entre as amostras (CULMAN et al., 2008). De acordo com Clement et al. (1998), deve-se ter cautela ao afirmar que cada T-RF seja uma espécie única ou uma única UTO, pois múltiplos organismos podem compartilhar T-RFs similares ou mesmo idênticos. Exceto quando se trabalha com um organismo isolado, *primers* para grupos específicos apresentam T-RFs frequentemente ambíguos, limitando o pesquisador de extrair o máximo de informação dos dados e podendo subestimar a verdadeira riqueza. Para minimizar este problema todas as análises foram realizadas com duas endonucleases. Foi mostrado por diversos grupos de pesquisadores que o uso de mais de uma endonuclease facilita a resolução de populações microbianas (LIU et al., 1997; MARSH, 1999). Outros ruídos nos dados, como eficiência na purificação do DNA, erros de pipetagem e estrutura das comunidades são minimizados quando os dados são transformados em valores relativos (DUNBAR et al., 2001).

A partir das planilhas organizadas, foram realizadas ordenações estatísticas (PCA e NMDS) e análise de riqueza.

3.2.2.5 Análise da Variabilidade do Espaço Intergênico Ribossomal de *Fungi* (ARISA)

As amostras de *Fungi* foram analisadas pela técnica de ARISA, a qual não necessita ser submetida a uma reação de restrição, pois o fragmento amplificado possui um polimorfismo natural, sendo possível uma análise direta no seqüenciador (FISHER; TRIPLETT, 1999). Após a purificação, as amostras foram ressuspensas em água ultrapura (Milli-Q) esterilizada e, uma alíquota de 1 µl foi utilizada para a análise no seqüenciador.

Os procedimentos para análise dos dados foram os mesmos utilizados para as amostras de T-RFLP, como citado no item 3.2.2.4.

2.2.2.6 Resultados da Análise de T-RFLP de *Bacteria* e *Archaea* e ARISA de *Fungi*

Os resultados dos eletroferogramas das análises de T-RFLP e ARISA das comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* são mostrados nas Figuras 3.5 e 3.6, respectivamente.

Uma análise visual prévia dos eletroferogramas mostrou uma nítida diferença na estrutura das comunidades microbianas estudadas entre os ambientes de manguezal preservado e antropizado. Nos eletroferogramas nota-se a presença de picos exclusivos para um dado ambiente, evidenciando a presença de UTO's únicas em cada ambiente. Desta forma, os ambientes estudados foram caracterizados por um perfil de eletroferograma distinto, mostrando o potencial das técnicas de T-RFLP e ARISA em discriminar as estruturas das comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* em solos, evidenciando a alteração nessas comunidades em função da ação antropogênica nesses ambientes.

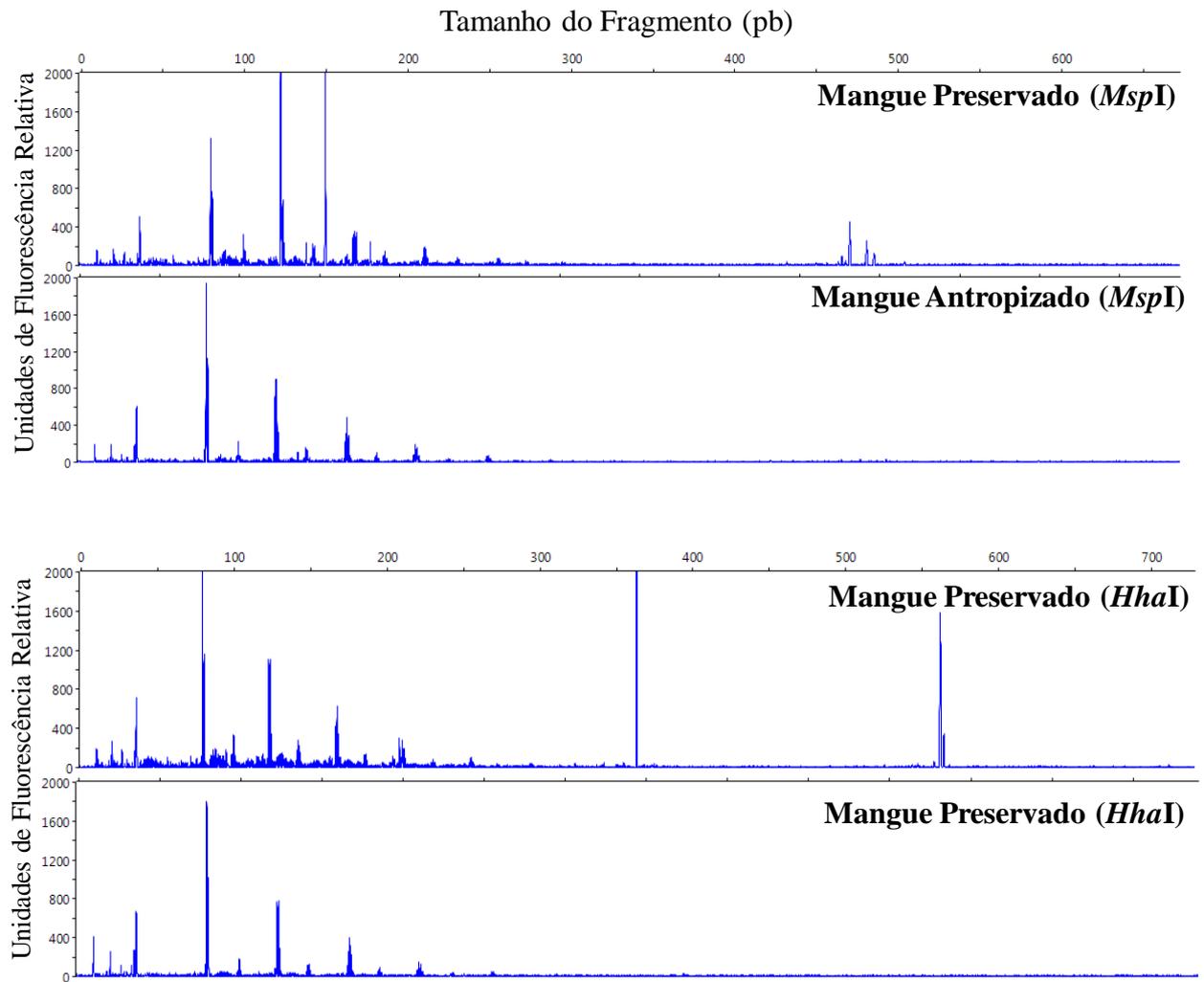


Figura 3.5 - Eletroferogramas das comunidades de *Bacteria* dos solos de mangue preservado e antropizado. Resultados de T-RFLP obtidos com a utilização das enzimas *MspI* e *HhaI*.

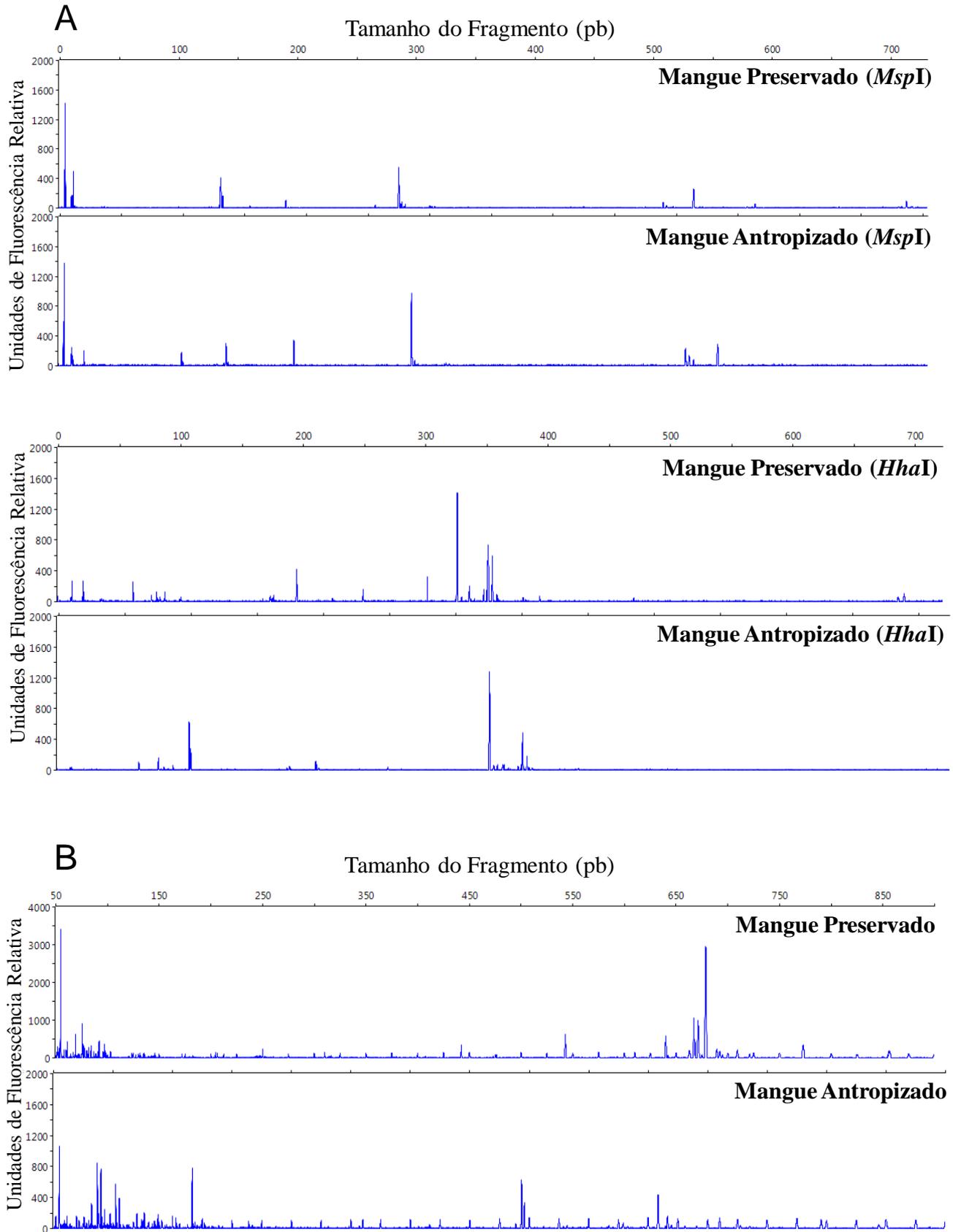


Figura 3.6 – (A) Eletroferogramas das comunidades de *Archaea* dos solos de mangue preservado e antropizado. Resultados de T-RFLP obtidos com a utilização das enzimas *MspI* e *HhaI*. (B) Eletroferogramas das comunidades de *Fungi* dos solos de mangue, floresta e restinga obtidos pela técnica de ARISA.

Após a análise visual dos eletroferogramas para conferência da qualidade da corrida, foram geradas matrizes de dados e, no programa Canoco 4.5, elas foram convertidas em matrizes de distância, utilizando o índice de Hellinger (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001; PERES-NETO et al., 2006).

Os perfis de T-RFLP e ARISA foram comparados calculando a abundância relativa dos fragmentos terminais de restrição para os dois ambientes. Histogramas são mostrados para os fragmentos com abundância relativa >1% (Figura 3.7), sendo considerados UTO's de organismos dominantes nessas comunidades (LEHOURS et al., 2005).

Para as comunidades de *Bacteria*, resultados com ambas as endonucleases apresentaram 18 T-RFs com fluorescência relativa >1%, representando aproximadamente 70% da fluorescência total. Em geral, tanto para a endonuclease *MspI* quanto para *HhaI*, as amostras de manguezal preservado apresentaram uma maior quantidade de T-RFs dominantes quando comparados com o manguezal antropizado, o que indica uma maior diversidade; no ambiente antropizado alguns T-RFs apresentaram uma maior abundância, o que indica uma menor diversidade. É possível notar também a presença de alguns T-RFs em um ambiente que não aparecem em outros, evidenciando a presença de UTO's exclusivas para cada ambiente. Os resultados com ambas endonucleases foram similares, o que confere robustez na análise. Essas observações sugerem uma clara diferença estrutural nas comunidades de *Bacteria* entre os dois ambientes estudados, evidenciando a influência da ação antropogênica nessas comunidades.

Para as comunidades de *Archaea*, os resultados com a enzima *MspI* apresentaram 17 T-RFs com fluorescência relativa >1%, representando aproximadamente 95% da fluorescência total; resultados com a enzima *HhaI* apresentaram 15 T-RFs com fluorescência relativa >1%, representando aproximadamente 90% da fluorescência total das amostras. É possível notar uma menor riqueza de T-RFs dominantes para o domínio *Archaea* quando comparado com *Bacteria*, isso é devido a uma menor quantidade de picos, evidenciando uma menor diversidade desses organismos nos ambientes estudados. Observações no histograma (Figura 3.7) mostram a presença de alguns T-RFs no manguezal preservado que não estão presentes no manguezal antropizado, o que revela a presença de alguns grupos em um manguezal que não estão presentes no outro, evidenciando o efeito da ação antropogênica sobre as comunidades de *Archaea*.

Para as comunidades de *Fungi*, 19 T-RFs apresentaram fluorescência relativa >1%, representando apenas 44,9% da fluorescência total. Ao contrário do que aconteceu com as comunidades de *Bacteria* e *Archaea*, os T-RFs dominantes das comunidades de fungos não representam a maioria dos membros dessa comunidade, o que indica uma alta diversidade fúngica nesses ambientes. Essa diferença na diversidade pode estar relacionada à técnica utilizada, pois para *Bacteria* e *Archaea* foi utilizado o T-RFLP e no caso de *Fungi* foi utilizado ARISA. Apesar de as técnicas serem bastante semelhantes quanto ao procedimento, o T-RFLP se baseia no gene 16S rRNA, enquanto o ARISA se baseia no espaço intergênico ribossomal. Um estudo realizado com amostras de solo comparou as duas técnicas e sugeriu que os resultados de ambas as técnicas estão muito relacionados (HARTMANN et al., 2005). Observações no histograma (Figura 3.7) mostram a presença de um T-RF dominante com alta abundância (55 pb) nas amostras de manguezal preservado, o que difere do manguezal antropizado. De maneira geral, como aconteceu com as comunidades de *Bacteria* e *Archaea*, as comunidades de *Fungi* também diferenciaram entre os ambientes estudados.

A Tabela 3.2 apresenta os dados da análise de similaridade ANOSIM (teste calculado com base no coeficiente de similaridade de Bray-Curtis), realizada utilizando o programa Primer5 (CLARKE, 1993).

Tabela 3.2 - Índice de Similaridade de ANOSIM obtidos com a técnica de T-RFLP e ARISA.

Ambiente	<i>Bacteria</i>		<i>Archaea</i>		<i>Fungi</i>
	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>	
Mangue Preservado					
x	0,775*	0,797*	0,428	0,454	0,996*
Mangue Antropizado					

^aANOSIM testa a diferença entre amostras. Valores de “r” são expressos, todos com p<0,001. Valores >0,75 são estatisticamente diferentes; >0,5 possuem sobreposição, mas ainda são claramente diferentes; e <0,5 não apresentam diferença estatística.

*valores de ANOSIM estatisticamente diferentes.

De maneira geral, a análise de ANOSIM revelou diferenças estatísticas significativas entre o manguezal preservado e o antropizado para as comunidades de *Bacteria* e *Fungi*, porém não apresentando diferença significativa entre as comunidades de *Archaea* nos diferentes ambientes avaliados.

O índice de Pielou (J') (PIELOU, 2000), apresentado na Tabela 3.3, revelou que todas as amostragens apresentaram bons resultados de equitabilidade, o que garante confiabilidade e robustez nas análises.

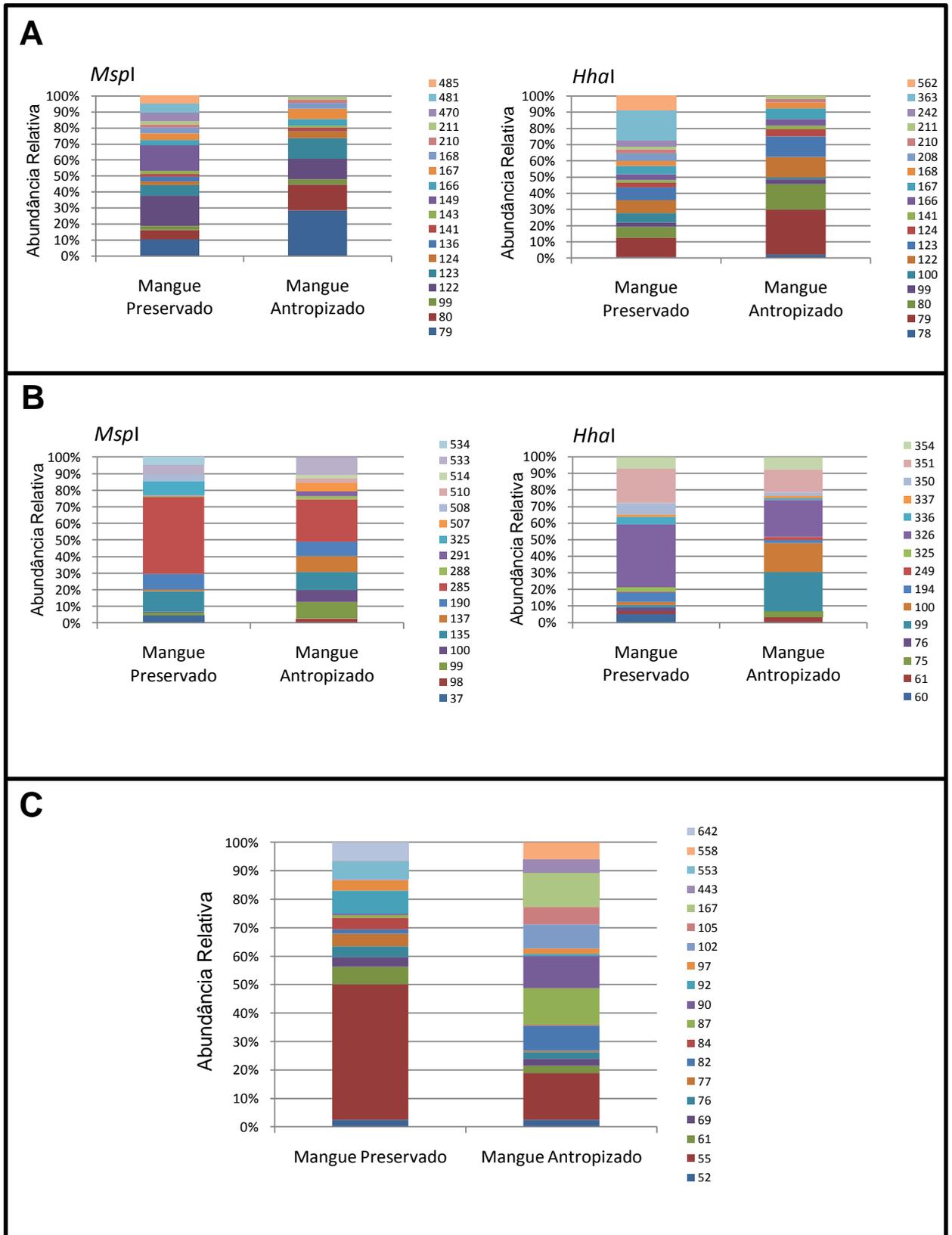


Figura 3.7 - Abundância relativa de T-RFs de comunidades de *Bacteria* (A) e *Archaea* (B) do gene 16S rRNA. Diagramas mostram os resultados depois de clivagem com *MspI* e *HhaI*. (C) Abundância relativa dos fragmentos do espaço intergênico ribossomal 18S-28S de *Fungi*. Os números na legenda indicam o tamanho dos fragmentos, em pares de bases, para fragmentos com abundância relativa >1%.

Tabela 3.3 - Equitabilidade^a das amostras obtidas usando T-RFLP e ARISA

Ambiente	<i>Bacteria</i>		<i>Archaea</i>		<i>Fungi</i>
	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>	
Mangue Preservado	0,825	0,840	0,855	0,801	0,821
Mangue Antropizado	0,808	0,803	0,885	0,819	0,910

^aÍndice de Pielou, quanto mais próximo de 1 maior é a equitabilidade da amostragem.

3.2.2.7 Estruturas das Comunidades Microbianas em Manguezal Preservado e Antropizado

A análise de Componentes Principais dos perfis de T-RFLP e ARISA das estruturas de comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* dos solos de mangue preservado e antropizado são mostradas na Figura 3.8.

Para as comunidades de *Bacteria*, as amostras foram separadas de forma distinta no gráfico de ordenação, formando grupos definidos para cada ambiente analisado; a variabilidade das amostras foi explicada 100% nos dois primeiros eixos plotados. A topologia global do gráfico feito através das duas endonucleases (*MspI* e *HhaI*) foi muito similar, mostrando confiabilidade nos dados. As amostras de manguezal antropizado foram agrupadas mais próximas entre si, revelando uma homogeneidade entre as réplicas.

Para as comunidades de *Archaea*, as amostras foram plotadas de forma mais dispersa, porém mantendo a ordenação similar à plotada para as comunidades de *Bacteria*, onde há uma clara separação entre os dois grupos. Desta forma, a distribuição da estrutura das comunidades de *Archaea* seguiu o mesmo padrão que as comunidades de *Bacteria*, revelando diferenças estruturais nessas comunidades em decorrência da ação antropogênica. Em ambos os gráficos, utilizando as duas endonucleases, os dois primeiros eixos explicaram 100% da variação total dos dados.

Para as comunidades de *Fungi*, as amostras foram plotadas de forma similar as comunidades de *Bacteria* e *Archaea*, porém apresentando dois grupos mais definidos. Da mesma maneira que o gráfico de ordenação de *Bacteria*, as amostras de mangue antropizado foram agrupadas mais próximas entre si, revelando uma homogeneidade entre as réplicas.

De modo geral, as análises de PCA realizadas com os dados de T-RFLP e ARISA das comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* revelaram diferenças estruturais na composição

dessas comunidades nos ambientes estudados, formando grupos definidos para o manguezal preservado e para o manguezal antropizado. Apesar de a análise de ANOSIM não apresentar uma diferença estatística significativa entre as comunidades de *Archaea* dos manguezais estudados, fica evidente no gráfico de ordenação da PCA que essas amostras apresentam estruturas diferentes, pois se agruparam de maneira distinta. Para as comunidades de *Bacteria* e *Fungi*, os valores de ANOSIM confirmam o que foi observado nas ordenações da PCA. Dessa forma, os dados corroboram a hipótese de que o efeito antropogênico no manguezal altera as comunidades microbianas presentes no solo.

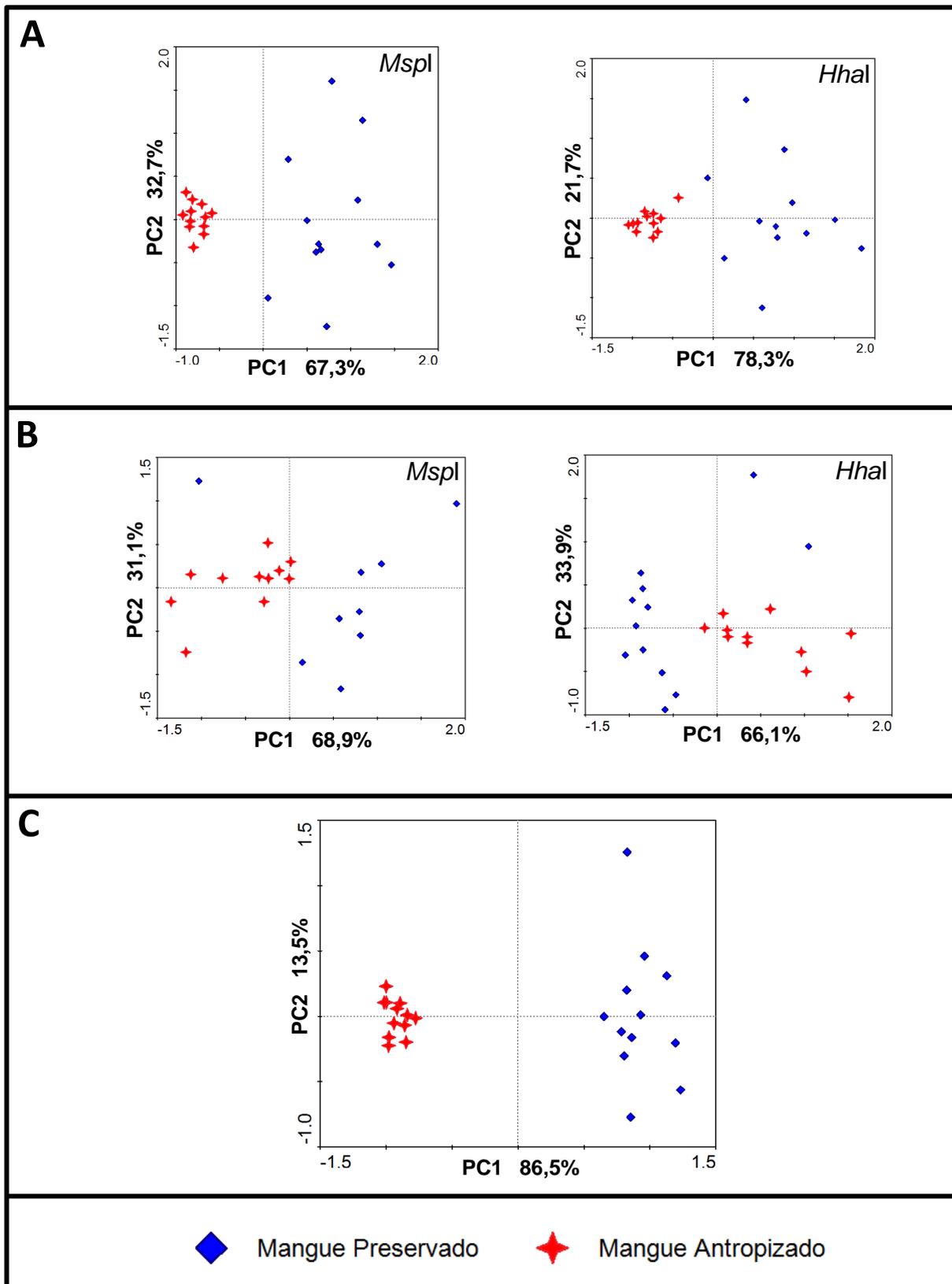


Figura 3.8 - Análises de Componentes Principais das comunidades microbianas dos solo estudados. (A) PCA das estruturas de comunidades de *Bacteria* determinadas por T-RFLP com as enzimas *MspI* e *HhaI*. (B) PCA das estruturas de comunidades de *Archaea* determinadas por T-RFLP com as endonucleases *MspI* e *HhaI*. (C) PCA das estruturas de comunidades de *Fungi* determinadas por ARISA. O valor correspondente à explicabilidade de cada eixo se encontra ao lado do gráfico.

3.2.2.8 Relação das Comunidades Microbianas com os Atributos dos Solos

Os dados de T-RFLP e ARISA foram correlacionados com os valores das propriedades químicas dos solos e ordenados utilizando a análise de NMDS, obtendo-se ordenações espaciais baseadas no índice de Hellinger (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001; PERES-NETO et al., 2006). As ordenações espaciais definidas para cada comunidade microbiana, combinada com os atributos químicos do solo são mostradas na Figura 3.9.

A análise de NMDS dos perfis de T-RFLP mostrou que as comunidades de *Bacteria* dos diferentes ambientes estudados diferem em estrutura e essas diferenças estão diretamente relacionadas aos atributos químicos do solo, pois estes explicam 62,4% e 75,1% da variabilidade total dos dados, respectivamente, para as endonucleases *MspI* e *HhaI*. Entre os atributos analisados, o K e o Ca são os que mais estão relacionados com a variabilidade dos dados. As amostras de manguezal antropizado apresentaram maiores valores para os atributos analisados.

A análise de NMDS dos perfis de T-RFLP para as comunidades de *Archaea* revelou que as diferenças na estrutura dessas comunidades nos diferentes ambientes estão bastante relacionados com os atributos químicos dos solos, os quais explicam 63,6% e 57,4% da variabilidade total dos dados, respectivamente, para as endonucleases *MspI* e *HhaI*, porém, essa variabilidade é menos explicada pelos atributos químicos do que para as comunidades de *Bacteria*. Entre os atributos analisados, a M.O., o K e Ca são os que mais estão correlacionados com a variabilidade dos dados.

A análise de NMDS dos perfis de ARISA para as comunidades de *Fungi* apresentou agrupamentos muito definidos para os dois ambientes, sendo que a variabilidade dos dados está bem relacionada com os atributos químicos do solo, que explicam 56,5% da variação total dos dados. Como ocorreu no caso das comunidades de *Archaea*, entre os atributos analisados, M.O., K e Ca são os que mais estão correlacionados com a variabilidade dos dados das comunidades de *Fungi*.

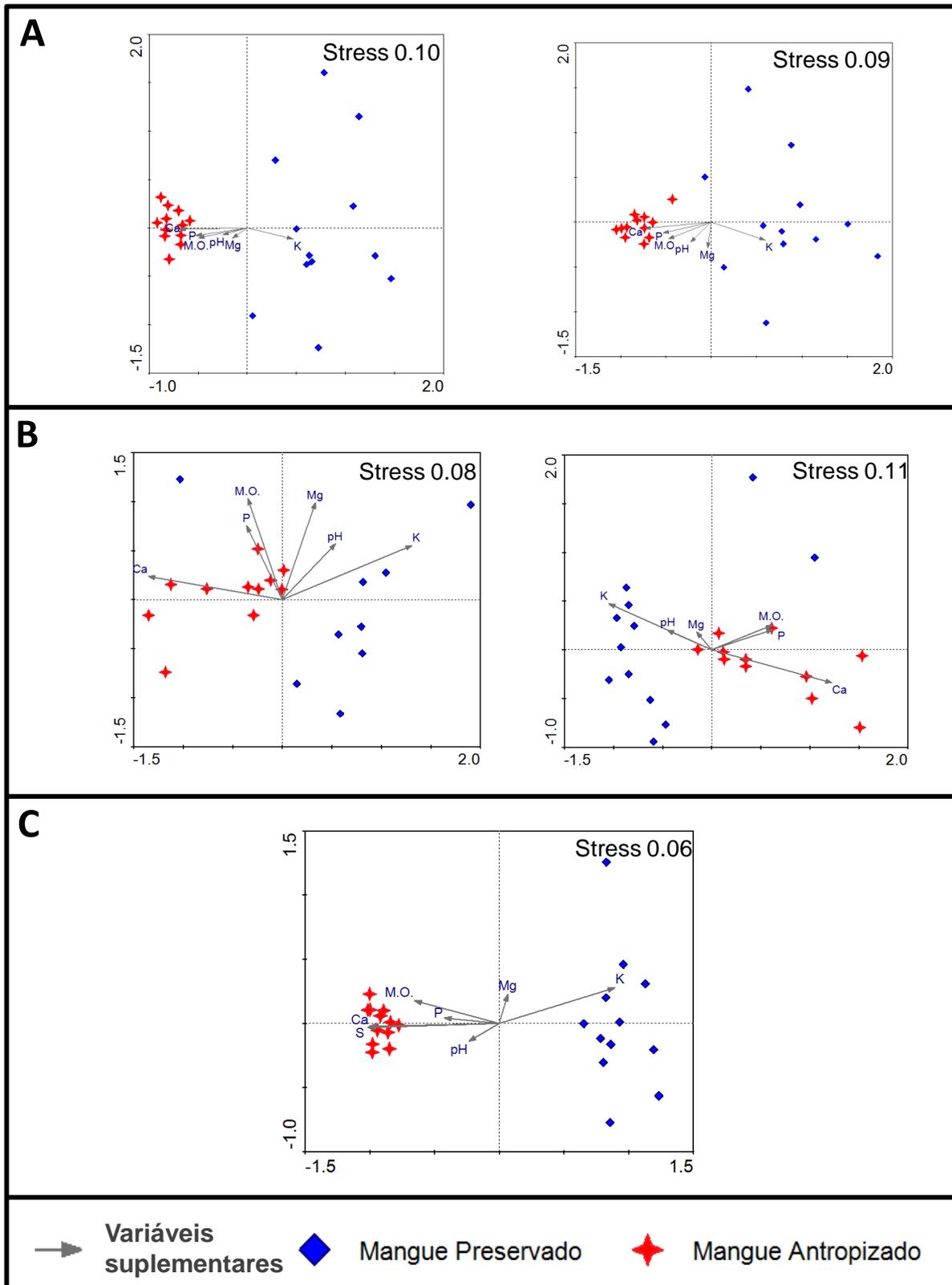


Figura 3.9 - *Non-metric multidimensional scaling* das comunidades microbianas dos solos estudados. (A) NMDS das estruturas de comunidades de *Bacteria* determinadas por T-RFLP com as enzimas *MspI* e *HhaI*. (B) NMDS das estruturas de comunidades de *Archaea* determinadas por T-RFLP com as endonucleases *MspI* e *HhaI*. (C) NMDS das estruturas de comunidades de *Fungi* determinadas por ARISA.

Em todas as análises, o pH não apareceu como atributo em destaque na explicação da variabilidade dos dados, isso pode ter ocorrido devido à pequena diferença nos valores de pH para os dois ambientes (ver Tabela 3.1), o que revela que a ação antrópica não afetou o pH do manguezal. Por outro lado, o K esteve bastante correlacionado com a explicabilidade da variação dos dados. Estudos com comunidades microbianas de solos tropicais mostraram uma alta relação com os atributos do solo, analisando, porém as primeiras profundidades (até 20 cm), onde há uma maior concentração de nutrientes (FIERER; JACKSON, 2006; CANNAVAN, 2007; JESUS et al., 2009).

Nesse trabalho, a profundidade amostrada foi até 40 cm, e, com o aumento da profundidade, é comum que ocorra uma diminuição do teor de nutrientes do solo e isso também reflete na diversidade das comunidades microbianas. Neste estudo observou-se que as comunidades de *Bacteria* e *Fungi* apresentaram maior riqueza de UTO's nas primeiras camadas dos solos estudados, o que corrobora dados de outros estudos já realizados com diversidade microbiana em solos (TORSVIK; GOKSOYR; DAAE, 1990; BORNEMAN; TRIPLETT, 1997; TSAI et al., 2003; FIERER; JACKSON, 2006; MEDAU, 2007; CANNAVAN, 2007).

Os solos de manguezais apresentam uma dinâmica de nutrientes diferente de qualquer outro ambiente. Eles são considerados ambientes altamente produtivos devido ao intenso suprimento de nutrientes, provenientes tanto do mar quanto do continente (WOODWEL et al., 1977; GETTER et al., 1984). Embora os ecossistemas de manguezal sejam ricos em matéria orgânica, em geral eles são deficientes em alguns nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (ALONGI; CHRISTOFFERSEN; TIRENDI, 1993; VAZQUEZ et al., 2000). Apesar disso, manguezais são altamente produtivos, e isso pode ser explicado pela eficiência no sistema de ciclagem de nutrientes, onde nutrientes essenciais são retidos e novos são regenerados da decomposição de material vegetal (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). Nesses ambientes, as comunidades microbianas são os maiores responsáveis pela ciclagem de nutrientes. Alongi (1988) afirma que, em manguezais tropicais, as comunidades de *Bacteria* e *Fungi* constituem 91% de toda a biomassa microbiana, o que também explica a menor diversidade de membros do Domínio *Archaea*. O efeito antropogênico sobre esses microrganismos pode alterar a estrutura dessas comunidades, rompendo com o equilíbrio do ecossistema.

Alguns estudos foram realizados avaliando o efeito de poluentes sobre as comunidades microbianas em solo de manguezais (CURY, 2002; NUNES, 2006; GOMES et al., 2007;

GOMES et al., 2008; TAKETANI et al., 2009). Entre os principais poluentes, os compostos de petróleo são os mais nocivos, produzindo danos imediatos aos organismos; os manguezais são especialmente afetados por estes poluentes, devido a derramamento por embarcações e a proximidade de regiões portuárias (LEWIS, 1983; NANSINGH; JURAWAN, 1999). Taketani et al. (2009), estudando comunidades microbianas de manguezal, avaliou a resposta dessas comunidades a um derramamento simulado de petróleo, mostrando que membros dos Domínios *Bacteria* e *Archaea* divergiram com relação ao controle não impactado. Outros estudos também mostraram que as estruturas de comunidades microbianas divergiram em repostas a poluentes (LABBE et al., 2007).

Os dados dessa pesquisa revelam que as estruturas das comunidades de microrganismos avaliadas divergiram em função da ação antropogênica. Em alguns casos houve perda de riqueza no ambiente impactado. Essa diferença está relacionada às mudanças nas propriedades químicas do solo, as quais podem ser decorrentes da presença humana em áreas de manguezais, como mostrado na Figura 3.4.

3.2.2.9 Análise de Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais

A partir dos dados obtidos com as técnicas de T-RFLP e ARISA, foram analisados os dados de riqueza de UTO's, onde, para cada T-RF encontrado no perfil de uma comunidade, uma UTO foi considerada. Como os experimentos foram realizados em triplicatas, se um pico de fluorescência estivesse presente em apenas uma das triplicatas, esse T-RF seria considerado como presente no ambiente, minimizando, assim, o efeito de organismos dominantes. A Figura 3.10 mostra os gráficos de riqueza de UTO's das comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* dos manguezais preservado e antropizado. Também foram construídos diagramas de Venn (FAUTH et al., 1996) para verificar as intersecções e peculiaridades entre os ambientes, identificando o número de UTO's únicas e compartilhadas entre os manguezais (Figura 3.10).

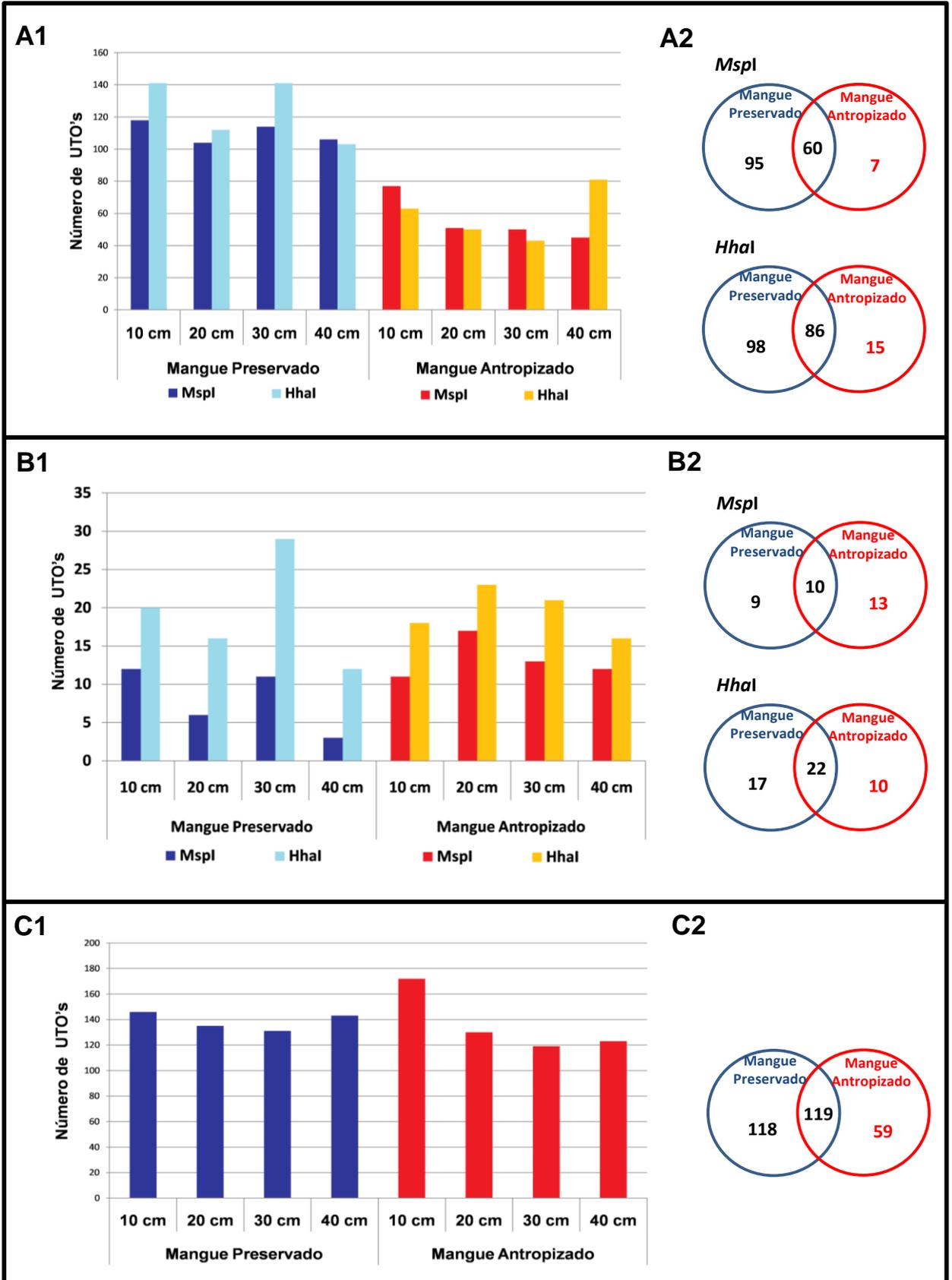


Figura 3.10 - Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO's) detectadas com as técnicas de T-RFLP [(A1) *Bacteria* e (B1) *Archaea*] e ARISA [(C1) *Fungi*]. Diagramas de Venn baseado nas UTO's para os grupos *Bacteria* (A2), *Archaea* (B2) e *Fungi* (C2).

Para as comunidades de *Bacteria*, as amostras de manguezal preservado apresentaram uma riqueza muito maior quando comparada com o manguezal antropizado. Para a endonuclease *HhaI*, o número de UTO's das amostras de manguezal preservado variou entre 112 e 141; para as amostras de mangue antropizado variou entre 43 e 81. Em geral, primeiras profundidades (10 e 20 cm) apresentaram os maiores valores de riqueza para o manguezal antropizado, que foi diminuindo com o aumento da profundidade, dados que confirmam uma maior diversidade nas primeiras camadas de solo, como descrito por Tsai et al. (2003); no manguezal preservado, as profundidades de 10 e 30 cm apresentaram maior riqueza. Da mesma forma que aconteceu com a riqueza, o número de UTO's únicas em cada ambiente foi maior nos ambientes com maior riqueza, sendo que no mangue preservado 61,2% (*MspI*) e 53,2% (*HhaI*) das UTO's encontradas foram exclusivas; no mangue antropizado apenas 10,4% (*MspI*) e 14,8% (*HhaI*) foram exclusivas. O número de UTO's comuns aos dois ambientes foi de 60 (*MspI*) e 86 (*HhaI*), revelando que grande parte dos membros presentes na comunidade são comuns aos dois ambientes. Os resultados de ambas endonucleases foram muito semelhantes, evidenciando confiabilidade nos dados.

Para as comunidades de *Archaea*, a riqueza de UTO's foi muito menor quando comparado com a riqueza das comunidades de *Bacteria*. A riqueza entre os ambientes não foram muito discrepantes entre si, sendo que com a endonuclease *HhaI* a riqueza foi maior no manguezal preservado, porém, com a endonuclease *MspI*, a riqueza foi maior no manguezal antropizado. Para as comunidades de *Archaea*, a maior riqueza se encontra nas maiores profundidades (30 e 40 cm), diferente do que ocorreu para o grupo *Bacteria* e *Fungi*, os quais apresentaram maior riqueza nas primeiras profundidades. Para a endonuclease *MspI*, o número de UTO's no manguezal preservado variou de 6 a 12; no manguezal antropizado de 11 a 17; para a endonuclease *HhaI*, o número de UTO's no manguezal preservado variou de 12 a 29; no manguezal antropizado de 16 a 23. A riqueza de UTO's apresentou grande diferença entre as endonucleases utilizadas, sendo que *HhaI* apresentou um maior número quando comparada com *MspI*. No manguezal preservado, 47,3% (*MspI*) e 43,5% (*HhaI*) das UTO's encontradas foram exclusivas desse ambiente; para as amostras de restinga, 56,5% (*MspI*) e 31,2% (*HhaI*) foram exclusivas. Os resultados revelam que quase a metade dos membros das comunidades de *Archaea* presentes no ambiente de manguezal preservado e antropizado são exclusivos, revelando que o efeito antrópico seleciona alguns membros dessas comunidades.

As comunidades de *Fungi* apresentaram uma estrutura semelhante às comunidades de *Bacteria*, onde a riqueza foi maior nas primeiras profundidades amostradas, como já foi descrito por Tsai et al. (2003). O número de UTO's do manguezal preservado variou de 131 a 146; no manguezal antropizado variou de 119 a 172. O número de UTO's únicas para o manguezal preservado foi de 118, e para o manguezal antropizado foi de 59. De maneira geral, a riqueza de UTO's foi bem menor no ambiente antropizado, revelando uma perda de diversidade com a ação antrópica nesses ambientes.

De maneira geral, comunidades de *Bacteria* e *Fungi* apresentaram maior riqueza de UTO's nas camadas mais superficiais, enquanto as comunidades de *Archaea* apresentaram uma maior riqueza nas maiores profundidades. Ovreas et al. (1997), estudando a diversidade microbiana em um lago com gradiente de salinidade e oxigenação, encontrou maior diversidade de *Bacteria* em amostras mais superficiais e maior diversidade de *Archaea* nas amostras mais profundas. Os mesmos resultados foram encontrados por Cury (2002), estudando as comunidades de *Bacteria* e *Archaea* de um manguezal contaminado por petróleo. Esses estudos corroboram os dados encontrados nessa pesquisa.

De acordo com os dados, a riqueza de UTO's dos grupos de *Bacteria* e *Fungi* foram maiores quando comparada com a riqueza de *Archaea* nos três ambientes estudados. Como para *Bacteria* e *Fungi*, membros do domínio *Archaea* ocorrem globalmente, e não somente naqueles ambientes considerados extremos (DeLONG, 1992; ZHANG et al., 2005; TESKE, 2006). Em estudo comparativo foi mostrado que, para a maioria dos ambientes, a diversidade de membros do domínio *Archaea* tende a ser relativamente menor do que a diversidade de membros do domínio *Bacteria*, dados que corroboram os resultados obtidos nessa pesquisa (ALLER; KEMP, 2008).

Supõe-se que essa diferença entre a diversidade dos grupos seja devido ao uso do ambiente por estes, que é mais restrito para *Archaea* do que para *Bacteria*. Membros do domínio *Archaea* podem viver em micro-nichos enquanto bactérias vivem mais amplamente ou em diferentes micro-nichos (ALLER; KEMP, 2008).

Os resultados também apontam uma perda de diversidade ocasionada pela ação antropogênica nesses ambientes, como aconteceu de forma clara para as comunidades de *Bacteria* e *Fungi*.

Através da análise dos diagramas de Venn (Figura 3.10), é possível notar grande quantidade de UTO's únicas para cada ambiente, revelando que a ação antropogênica mudou

as estruturas das comunidades microbianas presentes no manguezal. Estudos realizados com derramamento de óleo mostraram que o efeito desse contaminante leva as comunidades de manguezais a divergirem em relação a um ambiente não impactado (LABBE et al., 2007; TAKETANI et al., 2009).

As comunidades de *Archaea* não apresentaram uma grande variação na riqueza de UTO's, porém apresentaram estruturas diferentes. Em manguezais, que são ambientes anaeróbios, a maior parte das atividades de *Archaea* pode ser atribuída aos organismos metanogênicos e oxidadores de amônia (JORGENSEN, 1982). Esses dois grupos não usam complexos de hidrocarbonetos (presentes em óleos) como fonte de carbono, visto ser esses os maiores contaminantes de ambientes de manguezais (MUYZER; STAMS, 2008). Esta separação de nicho pode explicar a pequena divergência na riqueza de UTO's quando comparados os dois ambientes.

Os resultados de riqueza de UTO's utilizando as técnicas de T-RFLP e ARISA mostraram que houve perda de riqueza para as comunidades de *Bacteria* e *Fungi* no manguezal antropizado. Porém, para as comunidades de *Archaea*, a riqueza de UTO's não divergiu muito entre os ambientes. Dessa forma, fica evidenciado que o manguezal sob influência antrópica sofre alteração nas comunidades microbianas, tanto na estrutura como também na diversidade dessas comunidades.

3.2.2.10 Biblioteca Genômica do Gene 16S rRNA de *Archaea*

3.2.2.10.1 Amplificação e Purificação do Gene 16S rRNA de *Archaea*

A partir dos DNAs obtidos foram realizadas reações de amplificação com os *primers* 21f e 958r (DeLONG et al., 1992), específicos para o gene 16S rRNA para o Domínio *Archaea*. As reações de amplificação foram realizadas em triplicatas para as profundidades 10 e 40 cm dos manguezais preservado e antropizado. Os produtos de PCR amplificados geraram fragmentos de DNA de aproximadamente 950 pb, com rendimento suficiente para a realização da clonagem. As triplicatas foram homogeneizadas e purificadas com o Kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). As triplicatas foram homogeneizadas para minimizar os problemas de viés das reações de PCR.

3.2.2.10.2 Construção da Biblioteca 16S rRNA de *Archaea*

Neste estudo foram construídas bibliotecas genômicas do gene 16S rRNA de *Archaea* com o objetivo de comparar essas comunidades presentes no solo de manguezal preservado e de manguezal antropizado. Testes preliminares revelaram uma maior diferença na estrutura das comunidades de *Archaea* entre as profundidades de 10 e 40 cm. Dessa forma, foram construídas quatro bibliotecas a partir dos produtos de PCR, utilizando o vetor pGEM-T, sendo duas bibliotecas para o manguezal preservado, nas profundidades 10 e 40 cm; e duas bibliotecas para o manguezal antropizado, nas profundidades 10 e 40 cm. Para cada amostra de solo, amplificada com os *primers* específicos para o gene 16S rRNA de *Archaea*, foram selecionados 192 clones transformantes. No total foram selecionados 768 clones (oito placas de 96 clones) divididos entre as quatro bibliotecas.

Após a seleção dos clones, foi realizada a extração do DNA das células em solução de TE a uma temperatura de 95°C por 10 min . Após essa etapa, foi realizada uma reação de PCR utilizando os *primer* M13f e M13r (HUEY; HALL, 1989), para amplificação da região do vetor contendo o inserto de interesse. Após essa reação, a confirmação da presença o inserto foi feita através de gel de agarose 1%, checando a presença do fragmento do tamanho desejado.

3.2.2.10.3 Sequenciamento Parcial dos Clones e Análise das Sequências

A extração do DNA das colônias, a reação de PCR da região do inserto e a reação de sequenciamento foram feitas em larga escala, com 96 amostras por placa. Um total de 768 clones de 16S rRNA foram sequenciados e analisados, sendo 192 pertencentes a cada biblioteca:

- a) solo de manguezal preservado 10 cm (MP10);
- b) solo de manguezal preservado 40 cm (MP40);
- c) solo de manguezal antropizado 10 cm (MA10);
- d) solo de manguezal antropizado 40 cm (MA40).

Todos os clones foram seqüenciados utilizando o *primer* 21f. O seqüenciamento parcial é justificado uma vez que o objetivo é avaliar a diversidade e não realizar um estudo evolutivo detalhado.

Após o seqüenciamento, as amostras foram inseridas no site do RDP, onde foram analisadas com base na qualidade do seqüenciamento, obtendo-se 109, 145, 107 e 87 clones para o estudo das bibliotecas MP10, MP40, MA10 e MA40, respectivamente (Tabela 3.4), resultando em 448 clones. O tamanho mínimo das seqüências dos clones com qualidade Phred acima de 20 foi de 350 pares de bases. O número de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO's) foi determinado utilizando-se o programa DOTUR (Distance Based OTU and Richness Determination) (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005), considerando-se uma distância evolutiva de 0,03 através do algoritmo de *furthest neighbor*. O número de UTO's encontradas na biblioteca MP10 foi 35, na biblioteca MP40 foi 37, na biblioteca MA10 foi 40 e na biblioteca MA40 foi 33 (Tabela 3.4). As seqüências foram alinhadas utilizando o programa Clustal X 2.0 (LARKIN et al., 2007). O alinhamento foi utilizado para se calcular uma matriz de distância evolutiva através do DNADIST, programa do pacote PHYLIP 3.63, usando o algoritmo de Jukes e Cantor.

As seqüências geradas após a análise utilizando-se o programa DOTUR resultaram em um total de 374 seqüências.

Para a verificação quanto às diferenças entre as bibliotecas, foi usado o programa S-Libshuff versão 1.22 (disponível em: <http://libshuff.mib.uga.edu/>) (SINGLETON et al., 2001). Através deste programa as bibliotecas MP10, MP40, MA10 e MA40 foram comparadas entre si, resultando num valor de $p < 0,05$, indicando que as bibliotecas são estatisticamente diferentes entre si.

3.2.2.10.4 Análise da Diversidade das Comunidades de *Archaea*

O domínio *Archaea* engloba microrganismos que se desenvolvem em ambientes específicos, incluindo aqueles com altas temperaturas e salinidade, extremos de pH e ausência de oxigênio. Esse Domínio é atualmente composto por quatro filos: *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota* e *Nanoarchaeota*. Estes dois últimos ainda não são bem definidos, enquanto a maioria das espécies descritas se enquadra nos dois primeiros filos. O filo *Euryarchaeota* é considerado o mais diversificado fisiologicamente e inclui os

microrganismos metanogênicos, que crescem em nichos estritamente anaeróbios, além do halófitos e termófilos. O filo *Crenarchaeota* é mais restrito, incluindo organismos termófilos extremos que metabolizam o enxofre liberado por fontes hidrotermais (VETRIANI et al., 1999).

Através da classificação no RDP, das 374 seqüências analisadas, 360 pertencem ao Domínio *Archaea* e 12 não foram classificadas. Em todas as bibliotecas, o maior número de seqüências identificadas foi de microrganismos não-cultiváveis. Dos quatro filios de *Archaea* já caracterizados (*Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota* e *Nanoarchaeota*), apenas dois, *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota* foram detectados nas amostras dos manguezais (Figura 3.11).

Dos 360 clones classificados pertencentes ao Domínio *Archaea*, 35,28% foram classificados pertencendo ao filo *Crenarchaeota*, composto pela classe *Thermoprotei*; 30,28% dos clones foram classificados pertencendo ao filo *Euryarchaeota*, sendo alguns classificados dentro classe *Methanomicrobia* e a maioria não foi classificada ao nível de classe; e 34,44% dos clones não foram classificados dentro dos filios, apesar de serem classificados no Domínio *Archaea*. Nenhum clone classificado dentro dos filios *Korarchaeota* e *Nanoarchaeota*, o que é facilmente compreendido, pois os organismos desses grupos foram todos isolados de ambientes com altas temperaturas.

Os dados mostraram que para ambos os manguezais, os clones classificados no filo *Euryarchaeota* foram mais abundantes na profundidade de 10 cm, enquanto os clones classificados no filo *Crenarchaeota* foram mais abundantes na profundidade de 40 cm (Figura 3.11). Massana et al. (1997 e 1998), estudando a distribuição vertical de *Archaea* em ambiente marinho, verificou que o filo *Euryarchaeota* é mais abundante na superfície e o *Crenarchaeota* em profundidade. Cury (2006), estudando a diversidade de *Archaea* em manguezal também encontrou a mesma distribuição de filios nas profundidades, o que corrobora os resultados encontrados nesta pesquisa.

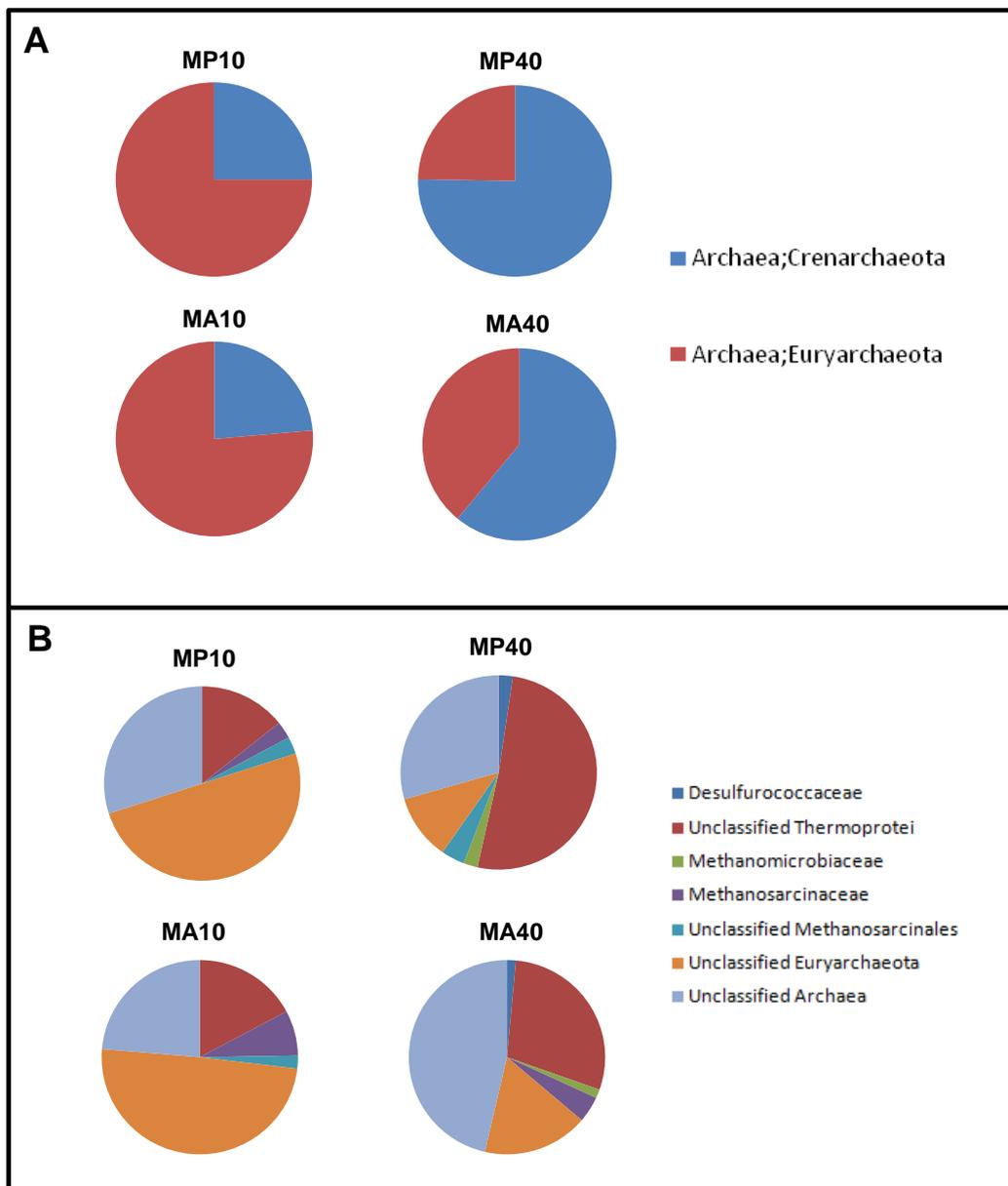


Figura 3.11 – Classificação filogenética dos clones de *Archaea* seqüenciados no estudo. (A) amostras classificadas ao nível de Filo. (B) amostras classificadas ao nível de família. MP10 – manguezal preservado 10 cm; MP40 – manguezal preservado 40 cm; MA10 – manguezal antropizado 10 cm; MA40 – manguezal antropizado 40 cm.

O filo *Crenarchaeota* é composto por organismos encontrados em ambientes extremos, como altas temperaturas e salinidades (BUCKLEY; GRABER; SCHMIDT, 1998; CHABAN; NG; JARREL, 2006; PAGALING et al., 2007; BUHRING et al., 2009), em ambientes marinhos (DeLONG, 1992; MASSANA et al., 1997; KARNER; DeLONG; KARL, 2001), solos (JURGENS; SAANO, 1999; BORNEMAN; TRIPLETT, 1997; NICOL; GLOVER; PROSSER, 2003), sedimentos de água doce (SCHLEPER; HOLBEN; KLENK, 1997; CLEMENTINO et al., 2006), como também sedimento estuarino e de manguezal (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001; KIM et al., 2005; CLEMENTINO et al., 2006; CURY et al.,

2006; YAN; HONG; YU, 2006). O filo *Euryarchaeota*, também amplamente distribuído nos ambientes naturais, é um grupo mais diversificado filogeneticamente e inclui microrganismos halofílicos, termofílicos e metanogênicos, entre outros (PESARO; WIDMER, 2002; HUANG et al., 2003; GIRGUIS et al., 2003).

Apesar de ser conhecida grande diversidade de organismos do Domínio *Archaea* em amostras ambientais, ainda não se sabe ao certo quais as funções que estes microrganismos desempenham no ambiente encontrado. Um dos grupos mais estudados até o momento é dos metanogênicos, classificados dentro do filo *Euryarchaeota*. Esses microrganismos são fundamentais na degradação anaeróbica de restos orgânicos com produção final de metano, um gás importante no aquecimento global, mas também com possível utilização como combustível não fóssil (LUTON et al., 2002). A produção de metano (CH_4) ocorre quando a decomposição da matéria orgânica é feita em condições anóxicas e ocorre intensamente quando não há aceptores de elétrons preferenciais como NO_3^- , Fe^{3+} e SO_2^{-2} (ACHTNICH; BAK; CONRAD, 1995).

Os manguezais constituem ambientes ideais para a presença de organismos metanogênicos, por se tratar de um ambiente anaeróbio. Apesar de sedimentos marinhos serem reconhecidamente ricos em sulfatos, têm sido detectadas atividades metanogênicas e microrganismos responsáveis por ela nesses ambientes (MUNSON; NEDWEL; EMBLEY, 1997). A manutenção da produção de metano no caso de ambientes ricos em sulfatos pode ser garantida pela capacidade de espécies de metanogênicas utilizarem substratos alternativos, não utilizados por bactérias sulfato-redutoras, como metanol, metilaminas e metionina (KING, 1984).

A função metanogênica atribuída as *Archaea* explica a presença de uma grande quantidade de clones das bibliotecas pertencentes ao filo *Euryarchaeota* (30,28%), onde também foram classificados clones pertencentes à classe *Methanomicrobia*, com membros das famílias *Methanomicrobiaceae* e *Methanosarcinaceae* (Figura 3.11). Em ambos os manguezais, clones pertencentes à família *Methanomicrobiaceae* foram detectados apenas na profundidade de 40 cm, enquanto clones pertencentes à família *Methanosarcinaceae* foram detectados nas duas profundidades amostradas em ambos os manguezais. Os membros da família *Methanomicrobiaceae* utilizam somente H_2 para o crescimento e a produção de metano (BALCH et al., 1979).

Os resultados também indicam uma diminuição da frequência de seqüências pertencentes ao filo *Euryarchaeota* com o aumento da profundidade. Cury (2006), estudando *Archaea* presentes em solos de mangue e marisma também apresentou resultados semelhantes, onde foi observada uma diminuição de seqüências tanto de *Euryarchaeota* como dos seus representantes metanogênicos com a profundidade. Cadillo-Quiroz et al. (2006), encontraram as maiores diferenças nas estruturas das comunidades de *Archaea* 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. De acordo com os autores, apesar de não haver grande variação do número de seqüências de 16S rRNA de *Archaea*, as amostras das 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*).

Apesar de haver o aparecimento de uma família na profundidade de 40 cm (*Methanomicrobiaceae*) que não está presente na profundidade de 10 cm, de maneira geral houve uma diminuição de clones pertencentes ao filo *Euryarchaeota* e, conseqüentemente, dos clones de organismos metanogênicos.

Dessa forma, nota-se que não houve alteração na distribuição dos filos de *Archaea* entre o manguezal preservado e antropizado, porém houve alteração em função da profundidade, o que também é corroborado pela análise dos amplicons 16S rRNA pelo S-Libshuff, que mostrou diferença significativa entre as profundidades.

A Figura 3.12 mostra a árvore filogenética obtida com o programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007), usando o método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987); as distâncias evolutivas foram computadas usando o método *Maximum Composite Likelihood* (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004) e estão em unidades do número de substituição de base por sítio. O valor de confiança dos braços da árvore foi determinado usando análise de bootstrap baseada em 1000 reamostragens. A árvore foi construída com base nas 100 UTO's determinadas pelo programa SONS (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2006) e classificadas no site GreenGenes (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>).

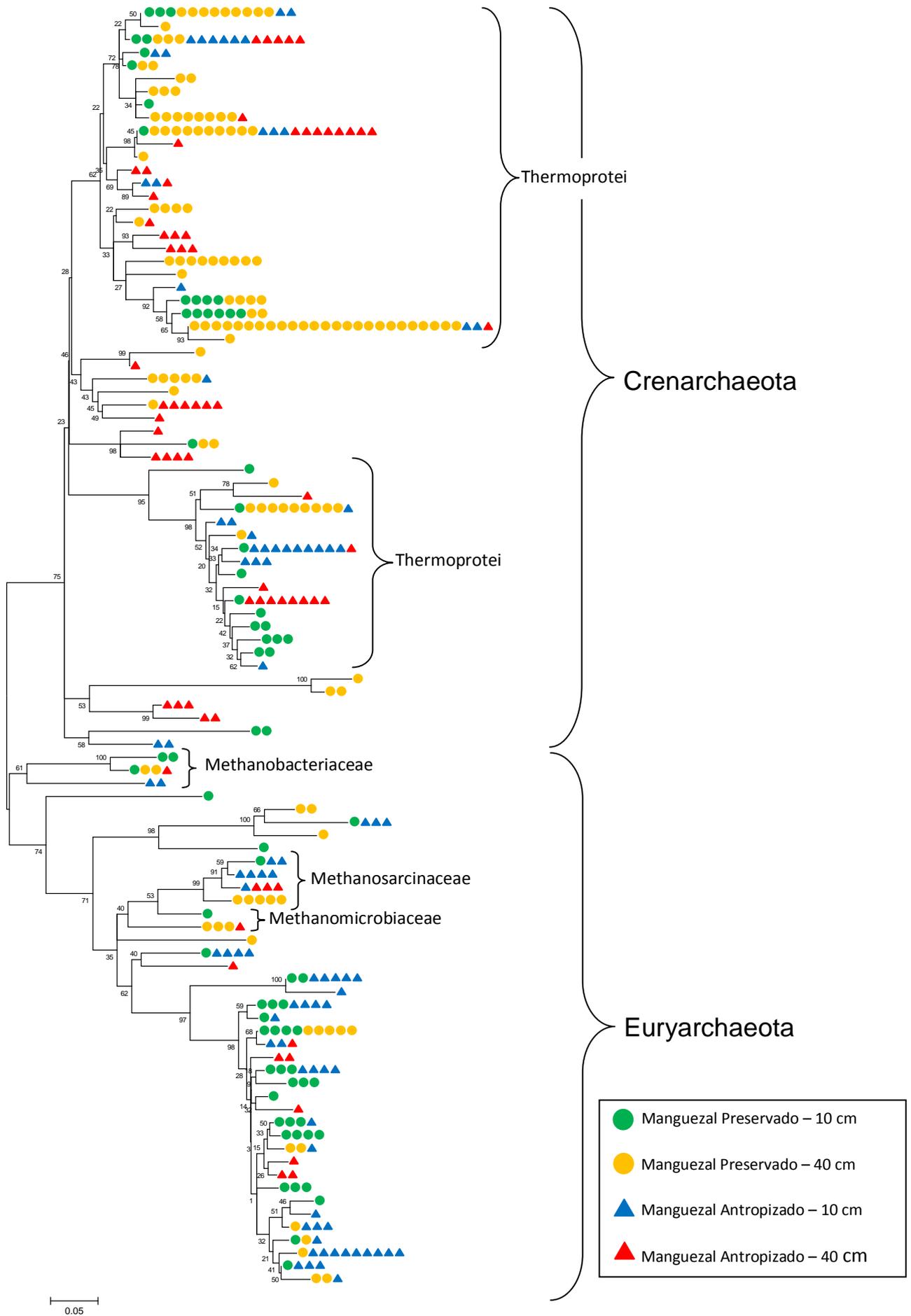


Figura 3.12 – Árvore Filogenética das bibliotecas do gene 16S rRNA de *Archaea*.

De acordo com a Árvore Filogenética, a maior parte das seqüências obtidas para ambos os manguezais na profundidade de 40 cm foram classificadas dentro do filo *Crenarchaeota*, já as seqüências das bibliotecas da profundidade de 10 cm foram classificadas como pertencentes ao filo *Euryarchaeota*. É possível notar que algumas UTO's apareceram somente em um ambiente, o que revela a presença exclusiva dessa UTO no ambiente amostrado. De maneira geral não houve diferença clara entre os manguezais preservado e antropizado, porém é notado a exclusividade de algumas UTO's em um manguezal ou outro.

Siboni et al. (2008) estudando *Archaeas* em amostras marinhas, associadas à corais, encontraram uma grande quantidade de membros da classe *Thermoprotei*, constituindo a maioria dos clones de *Crenarchaeota*, o que explica a grande quantidade de clones dos manguezais classificados nessa classe, de acordo com a Árvore Filogenética.

Yan, Hong e Yu (2006) estudando a diversidade de membros do domínio *Archaea* em um manguezal da China encontrou 80,4% de clones pertencentes ao filo *Crenarchaeota* e 19,6% pertencentes ao filo *Euryarchaeota*. Porém, foi feita uma amostragem dos primeiros 30 cm, sendo homogeneizadas as amostras. Eles também verificaram que as comunidades de *Archaea* de manguezal parecem ser uma mistura de organismos encontrados em uma variedade de ambientes, com a maioria pertencente ao ambiente marinho. Ananda e Shridar (2002) afirmam que a microflora de manguezais é composta de uma combinação de microrganismos terrestres, marinhos e de rios, confirmando os resultados encontrados nesta pesquisa. Como já discutido no capítulo 2, o manguezal preservado utilizado nesta pesquisa compartilha espécies presentes nos ambientes de restinga e floresta. A árvore filogenética representada na Figura 3.12 apresentou um grupo próximo à espécie *Cenarchaeum symbiosum*, encontrada em oceanos (PRESTON et al., 1996); também agrupou amostras dentro de um clado dos organismos metanogênicos, como por exemplo, os gêneros *Methanobacterium* e *Methanolobus*, encontradas em lugares salinos, confirmando os resultados encontrados por Yan, Hong e Yu (2006). Já é conhecido que os dois maiores filios *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota* podem corresponder a mais de um terço de todas as células procariontes encontradas nos oceanos (KARNER; DeLONG; KARL, 2001), o que explica a presença de organismos marinhos no sedimento de manguezal.

3.2.2.10.5 Estimativa de Riqueza e Índices de Diversidades

A estimativa do valor máximo de UTO's em um nível filogenético pode ser feita utilizando-se métodos estatísticos capazes de extrapolar a relação de UTO's em função do número de seqüências a partir da curva de rarefação ou de métodos não paramétricos. Neste trabalho a riqueza de filotipos foi verificada por meio do método de rarefação ao nível de 97% de similaridade e pelos métodos não-paramétricos de estimativa *ACE* (CHAO; MA; YANG, 1993) e *CHAO1* (CHAO, 1984 e 1987) (Figura 3.13 e Tabela 3.4).

Esses resultados indicam que o número de seqüências 16S rRNA não amostrou completamente a riqueza de filotipos das comunidades bacterianas. No entanto, tais curvas revelam as diferenças entre as bibliotecas a partir de 70 seqüências avaliadas. É possível notar claramente uma maior riqueza de UTO's na biblioteca MP10 em comparação com a biblioteca MP40. Para o manguezal antropizado, a riqueza permaneceu a mesma entre as bibliotecas MA10 e MA40. De maneira sutil observa-se uma riqueza maior para a biblioteca MP10 em comparação com as bibliotecas do manguezal antropizado (MA10 e MA40).

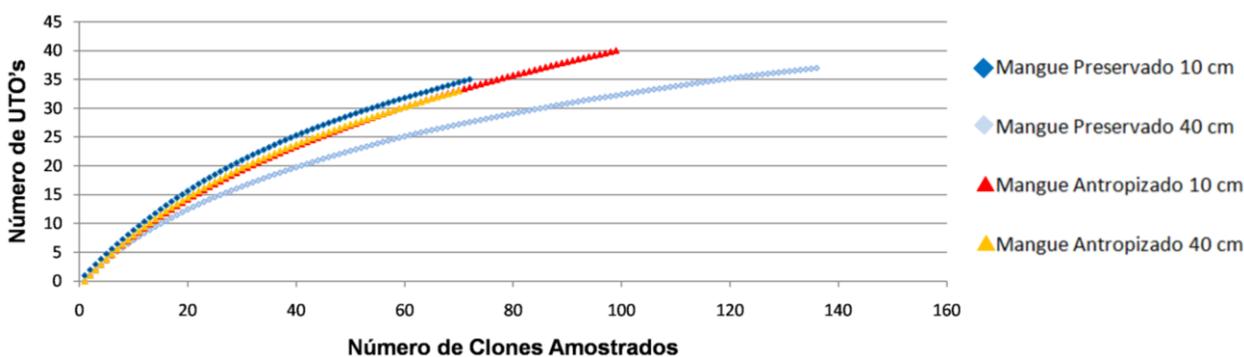


Figura 3.13 – Análise de rarefação gerada para o gene 16S rRNA de *Archaea* de bibliotecas genômicas das amostras coletadas dos manguezais. Os clones foram agrupados em filotipos baseados na similaridade das seqüências com nível de similaridade >97%.

Tabela 3.4 – Estimativas de riqueza de UTO's e índices de diversidade calculados a partir das bibliotecas de 16S rRNA de *Archaea* de solo de manguezal preservado e antropizado.

Bibliotecas			Estimativas de Riqueza de UTO's			Índices de Diversidade	
	NS	NU	ACE*	Chao1*	JackKnife	Simpson	Shannon
MP10	109	35	53,3 (41,7)(84,8)	56,8 (14,8)(46,5)	58,4 ±15,3	0,0273	3,63 ±0,18
MP40	145	37	56,4 (44,3)(87,8)	47,5 (40,1)(72,4)	52,0 ±10,7	0,0663	3,07 ±0,18
MA10	107	40	70,3 (52,3)(114,2)	59,0 (46,4)(95,8)	60,38 ±12,6	0,0382	3,35 ±0,18
MA40	87	33	55,0 (41,1)(92,5)	58,5 (41,0)(113,7)	62,97 ±19,6	0,0319	3,27 ±0,19

MP10 – manguezal preservado 10 cm; MP40 – manguezal preservado 40 cm; MA10 – manguezal antropizado 10 cm; MA40 – manguezal preservado 40 cm. NS – número de seqüências; NU – número de UTO's. *ACE e Chao1 – os números nos parênteses são referentes aos valores mínimos e máximos do intervalo de confiança.

Os valores do índice de diversidade de *Shannon* revelaram maior diversidade na biblioteca MP10 e menor na biblioteca MP40. Essa diferença entre amostras do mesmo manguezal pode ser explicada pelo fato de que o manguezal preservado encontra-se em sua forma natural, sem histórico de perturbação, o que mantém o padrão de diversidade encontrado em solos, onde as primeiras camadas apresentam uma maior diversidade (TSAI et al., 2003). De maneira geral, as profundidades de 10 cm de ambos os manguezais apresentaram maior diversidade quando comparadas com as profundidades de 40 cm. A mesma relação de diversidade de UTO's foi estabelecida entre as bibliotecas com os valores obtidos pelo índice de diversidade de *Simpson*.

Os valores obtidos com os métodos não-paramétricos *ACE*, *CHAO1* e *Jackknife* para a estimativa de riqueza de UTO's revelou uma interpretação inversa à obtida com os índices de diversidade. A justificativa para tal interpretação pode estar no número de seqüências analisadas e na equação utilizada em cada estimador, por exemplo, o estimador *Jackknife* usa o valor de UTO's únicas para o cálculo da estimativa de riqueza. Mas, de maneira geral, a profundidade de 10 cm em ambos os manguezais apresentou maior estimativa de riqueza quando comparadas com a profundidade de 40 cm. Esses dados apresentam resultados semelhantes aos estudos de comunidades microbianas em solos, onde a maior diversidade é encontrada nas primeiras camadas do solo (TORSVIK; GOKSOYR; DAAE, 1990; BORNEMAN; TRIPLETT, 1997; TSAI et al., 2003; FIERER; JACKSON et al., 2006; MEDAU, 2007).

Foram construídos diagramas de Venn (FAUTH et al., 1996) para verificar as intersecções e peculiaridades entre os ambientes, identificando o número de UTO's únicas e

compartilhadas entre as profundidades dentro de um mesmo manguezal e entre os manguezais preservado e antropizado numa mesma profundidade (Figura 3.14)

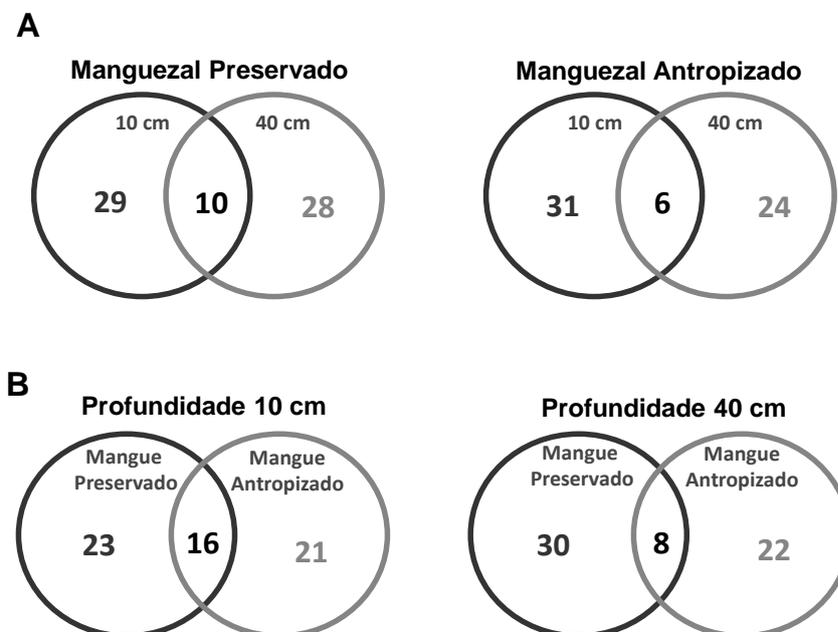


Figura 3.14 – Diagramas de Venn baseados nas UTO's das bibliotecas 16S rRNA de *Archaea* para os manguezais preservados e antropizados. (A) diagramas entre as profundidades num mesmo mangue; (B) diagramas comparando os manguezais numa mesma profundidade. As intersecções mostram o número de UTO's compartilhadas.

Através da análise dos diagramas de Venn é possível notar uma maior riqueza de UTO's no manguezal preservado em relação ao manguezal antropizado. É interessante notar também que há mais UTO's comuns compartilhadas entre os diferentes manguezais (Figura 3.14) do que dentro de um mesmo manguezal, revelando uma alteração das estruturas das comunidades de *Archaea* com o aumento da profundidade. O ambiente de manguezal se caracteriza por um alto dinamismo, pois o solo está permanentemente saturado com água, a qual se movimenta com os fluxos e refluxos da maré, afetando principalmente a superfície, o que explica a diferença dessas comunidades em função da profundidade do solo amostrado (ZHOU et al., 2002).

Os dados obtidos nessa pesquisa mostram uma alteração na estrutura das comunidades de *Archaea* em função da ação antropogênica nesses ambientes, revelando uma pequena perda

de diversidade. Essa menor diversidade pode estar relacionada com os atributos físico-químicos dos solos, que por sua vez podem ser alterado em função da ação antrópica. Apesar dessa diferença na diversidade ser pequena, a análise realizada com o programa S-libshuff apontou diferença significativa entre as bibliotecas, indicando que a ação antropogênica pode influir nas estruturas das comunidades de *Archaea*, sem alterar de forma expressiva a riqueza de espécies. Yun et al. (2008) sugerem que microrganismos presentes em solo de manguezais sejam altamente bioativos, com capacidade de se adaptarem à ambientes desfavoráveis. Por outro lado, a eliminação de espécies em resposta a um distúrbio favorece o aumento da população de outros microrganismos presentes neste solo, resultando em uma alteração na composição das espécies (DIAZ-RAVIÑA; BAATH, 1996).

A ação antrópica pode estar ligada a eventos de desmatamento e contaminação do sedimento de manguezal, porém, um estudo mais detalhado pode contribuir com informações importantes para a preservação desse ecossistema.

Nas últimas décadas, um interesse maior tem sido dado à preservação de áreas de manguezais, devido as suas muitas funções desempenhadas no ambiente. Porém, para ser aproveitado de maneira sócio-econômica, a atividade microbiana deve ser conhecida. Apesar do recente interesse (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001; BEMAN; FRANCIS, 2006; YAN; HONG; YU, 2006; LIANG et al., 2007; TAKETANI et al., 2009), nosso conhecimento ainda é insuficiente sobre o envolvimento de vários taxons em processos específicos. As comunidades de bactérias e fungos residentes nos ecossistemas de manguezais desempenham os principais papéis na transformação de nutrientes (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). Enquanto a importância desses dois grupos nos ciclos biogeoquímicos é bem estabelecida e conhecida, nosso conhecimento das comunidades de *Archaea* nos manguezais ainda é extremamente limitado (YAN; HONG; YU, 2006). Dessa forma, este trabalho contribuiu com informações a cerca da presença de microrganismos do Domínio *Archaea* em solos de manguezal e sua possível utilização na análise da qualidade ambiental.

Para aumentar a eficiência das políticas de preservação, principalmente em países em desenvolvimento, há uma necessidade de demonstrar a multi-funcionalidade dos manguezais combinando a mitigação de poluição e degradação com a educação ambiental conservacionista.

3.3 Conclusão

O emprego das técnicas moleculares de T-RFLP, ARISA, clonagem e seqüenciamento revelou que a ação antropogênica em ambientes de manguezais tem efeito sobre as comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi*, alterando as estruturas dessas comunidades e causando perda de diversidade.

Adicionalmente, este trabalho revelou que as estruturas das comunidades microbianas estão relacionadas aos atributos físico-químicos do solo, os quais sofrem influência de ações antropogênicas de poluição e desmatamento; as comunidades microbianas também apresentam distribuição diferenciada em função da profundidade amostrada.

Os resultados apontam que o uso de ferramentas moleculares no estudo de comunidades microbianas de solo pode ser útil para o monitoramento do impacto de ações antrópicas nos ambientes de manguezais, contribuindo com o conhecimento da diversidade de microrganismos e avaliando o efeito da ação antropogênica sobre essas comunidades.

Em suma, os dados dessa pesquisa relevam a importância da preservação dessas áreas e seu possível potencial biotecnológico, fornecendo informações para o uso sustentável e a preservação desses ecossistemas.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AKSORNKOAE, S.; ARROYO, C.; BLASCO, F.; BURBRIDGE, P.R.; TUCK, C.H.; CINTRON, G.; DAVIE, J.D.S.; DIXON, J.A.; HAMILTON, L.S.; HEALD, E.; HEGERL, E.; LAL, P.; LUNA LUGO, A.; PANNIER, F.; RAMDIAL, B.; SAENGER, P.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; SCHWEITHELM, J.; SNEDAKER, S.C.; SRIVASTAVA, P.D.L.; WEIDENBACH, R.; YOKEL, B.; DIXON, R.G.; EONG, O.J.; SAIFULLAH, S.M. **Handbook for mangrove area management**. Honolulu, Hawaii: United Nations Environment Program and East-West Center, Environment and Policy Institute, 1984.
- ALLER, J.Y.; KEMP, P.F. Are Archaea inherently less diverse than Bacteria in the same environments? **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 65, p. 74-87, 2008.
- ALONGI, D.M. The dynamics of benthic nutrient pools and fluxes in tropical mangrove forests. **Journal of Marine Research**, New Haven, v. 54, p. 123-148, 1996.
- ALONGI, D.M.; CHRISTOFFERSEN, P.; TIRENDI, F. The influence of forest type on microbial-nutrient relationships in tropical mangrove sediments. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 171, p. 201-223, 1993.
- ALONGI, D.M. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. **Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 59-79, 1988.
- ANANDA, K.; SRIDHAR, K.R. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 871-878, 2002.
- BALCH, W.E.; FOX, G.E.; MAGRUM, L.J.; WOESE, C.R.; WOLF, R.S. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 43, n. 2, p. 260-296, 1979.
- BEMAN, J.JM; FRANCIS, C.A. Diversity of ammonia-oxidizing Archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified Subtropical Estuary: Bahia del Tobari, México. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 7767-7777, 2006.
- BLACKWOOD, C.B.; MARSH, T.; KIM, S.H.; PAUL, E.A. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 2, p. 926-932, 2003.
- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial populations shifts associated

with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 2647-2653, 1997.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: Atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, New York, v. 36, p. 214-216, 2004.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Especificações e normas técnicas para a elaboração de cartas de sensibilidade ambiental para derramamentos de óleo**. Brasília, DF, 2004. 22 p. anexos.

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.

BUHRING, S.I.; SMITTENBERG, R.H.; SACHSE, D.; DI LIPP, J.S.; GOLUBIA, S.; SACHS, J.P.; HINRICHS, K.V.; SUMMONS, R.E. A hypersaline microbial mat from Pacific Atoll Kiritimati: insights into composition and carbon fixation using biomarker analyses and a C-13-labeling approach. **Geobiology**, Maldem, v. 7, n. 3, p. 308-323, 2009.

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, v. 8, n. 8, p. 1428-1440, 2006.

CANNAVAN, F.S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental**. 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CHABAN, B.; NG, S.Y.M.; JARRELL, K.F. Archaeal habitats from the extreme to the ordinary. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 73-116, 2006.

CHAN, O.C.; CASPER, P.; SHA, L.Q.; FENG, Z.L.; FU, Y.; YANG, X.D.; ULRICH, A.; ZOU, X.M. Vegetation cover of Forest, shrub and pasture strongly influences soil bacterial community structure as revealed by 16S rRNA gene T-RFLP analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 449-458, 2008.

CHAN, O.C.; YANG, X.; FU, Y.; FENG, Z.; SHA, L.; CASPER, P.; ZOU, X.M. 16S rRNA gene analysis of bacterial community structures in the soils of evergreen broad-leaved forests in south-west China. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 58, p. 247-259, 2006.

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

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

CHAO, A.; MA, M.C.; YANG, M.C.K. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. **Biometrika**, Oxford, v. 80, p. 193-201, 1993.

CLARKE, K.R. Nonparametric multivariate analyses of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, Carlton, v. 18, p. 117-143, 1993.

CLEMENT, B.G.; KEHL, L.E.; DEBORD, K.L.; KITTS, C.L. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 31, p.135-142, 1998.

CLEMENTINO, M.M.; FERNANDES, C.C.; VIEIRA, R.P.; CARDOSO, A.M.; POLYCARPO, C.R.; MARTINS, O.B. Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 103, p. 141-151, 2007.

COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; McGARRELL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 37, p. 141-145, 2009.

CULMAN, S.W.; GAUCH, H.G.; BLACKWOOD, C.B.; THIES, J.E. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, p. 55-63, 2008.

CURY, J. C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo 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.

CURY, J.C. **Diversidade de Bacteria e Archaea em solos de mangue e marisma**. 2006. 147p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

DELONG, E.F. Archaea in coastal marine environments. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 89, p. 5685-5689, 1992.

DIAZ-RAVIÑA, M.; BAATH, E. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2970-2977, 1996.

EDEL-HERMANN, V.; DREUMONT, C.; PÉREZ-PIQUERES, A.; STEINBERG, C. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal RNA genes to assess

changes in fungal community structure in soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 47, p. 397-404, 2004.

ENGBRETSON, J.J.; MOYER C.L. Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal restriction fragment length polymorphism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 4823–4829, 2003.

FAUTH, J.E.; BERNARDO, J.; CAMARA, M.; RESETARITS Jr., W.J.; VAN BUSKIRK, J.; McCOLLUM, S.A. Simplifying the jargon of community ecology: a conceptual approach. **The American Naturalist**, Chicago, v. 147, n. 2, p. 282-286, 1996.

FIERER, N. & JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 103, n. 3, p.626-631, 2006.

FISHER, M. M.; TRIPLETT, E. W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p. 4630– 4636, 1999.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LIBURUN, T.G. Taxonomic outline of prokaryotes. In: **Bergey's manual of systemativbacterriology**. 2° ed. Release 5.0. New York: Springer, 2004.

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, p65-113.

GOMES, N.C.; BORGES, L.R.; PARANHOS, R.; PINTO, F.N.; MENDONCA-HAGLER, L.C.S.; SMALLA, K. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. **FEMS Microbiology Ecology**. Amsterdam, v. 66, p. 96-109, 2008.

GOMES, N.C.; BORGES, L.R.; PARANHOS, R.; PINTO, F.N.; KROGERRECKLENFORT, E.; MENDONCA-HAGLER, L.C.S.; SMALLA, K. Diversity of *ndo* genes in mangrove sediments exposed to different sources of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 73, p. 7392-7399, 2007.

GUIRGUIS, P.R.; ORPHAN, V.J.; HALLAN, 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.

HARTMANN, M.; WIDMER, F. Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 12, p. 7804-7812, 2006.

HARTMANN, M.; FREY, B.; KOLLIKER, R.; WIDMER, F. Semi-automated genetic analysis of soil microbial communities: comparison of T-RFLP and RISA based on descriptive and discriminative statistical approaches. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 61, p. 349-360, 2005.

HAYASHI, H.; TAKAHASHI, R.; NISHI, T.; SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Molecular analysis of jejuna, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. **Journal of Medical Microbiology**, Berks, v. 54, p. 1093-1101, 2005.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems; an overview. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 33, p. 265-278, 2001.

HUANG, L.N.; CHEN, Y.Q.; ZHOU, H.; LUO, S.; LAN, C.Y. Characterization of methanogenic Archaea in the leachate of a closed municipal solid waste landfill. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 46, p. 171-177, 2003.

HUEY, B.; HALL, J. Hypervariable DNA fingerprint in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 171, p. 2528-2532, 1989.

JESUS, E.C.; MARSH, T.L.; TIEDJE, J.M.; MOREIRA, F.M.S. Changes in land use alter structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **ISME Journal**, Heteren, p. 1-8, 2009.

JORGENSEN, B.B. Mineralization of organic-matter in the sea bed- the role of sulfate reduction. **Nature**, London, v. 296, p. 643-645, 1982.

JURGENS, G.; SAANO, A. Diversity of soil Archaea in boreal Forest before, and after clear-cutting and prescribed burning. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 205-213, 1999.

KARNER, M.B.; DeLONG, E.F.; KARL, D.M. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. **Nature**, London, v. 409, p. 507-510, 2001.

KATHIRESAN, K.; BINGHAN, B.L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, San Diego, v. 40, p. 81-251, 2001.

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.

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.

LABBE, D.; MARGESIN, R.; SCHINNER, F.; WHYTE, L.G.; GREER, C.W. Comparative phylogenetic analysis of microbial communities in pristine and hydrocarbon-contaminated alpine soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 59, p. 466-475, 2007.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LEE, H.K.; KIM, H.R.; MENGONI, A.; LEE, D.H. Modified T-RFLP methods for taxonomic interpretation of T-RF. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 18, n. 4, p. 624-630, 2008.

LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E.D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. **Oecologia**, New York, v. 129, p. 271-280, 2001.

LeHOURS, A.C.; BARDOT, C.; THENOT, A.; DEBROAS, D.; FONTY, G. Anaerobic microbial communities in Lake Pavin, a unique meromictic lake in France. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 7389-7200, 2005.

LEWIS, R.R.I. Impact of oil spills on mangrove forests, p. 171-183. In: TEAS, H.J. (Ed.). **Tasks for vegetation science**. The Hague: Dr. W. Junk Publishers, 1983. (Biology and Ecology of Mangroves, 8).

LIANG, J.B.; CHEN, Y.Q.; LAN, C.Y.; TAM, N.F.Y.; ZAN, Q.J.; HUANG, L.N. Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. **Marine Biology**, New York, v. 150, p. 739-747, 2007.

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 rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4516-4522, 1997.

LUTON, P.E.; WAYNE, J.M.; SHARP, R.J.; RILEY, P.W. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the Phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. **Microbiology**, New York, v. 148, p. 3521-3530, 2002.

MARSH, T.L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, p. 323-327, 1999.

MASSANA, R.; MURRAY, A.E.; PRESTON, C.M.; DeLONG, E.F. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archaea* in Santa Barbara Channel. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 50-56, 1997.

MASSANA, R.; TAYLOR, L.T.; MURRAY, A.E.; WU, K.Y.; JEFFREY, W.H.; DeLONG, E.F. Vertical distribution and temporal variation of marine planktonic *Archaea* in the Gerlache Strait, Antarctica, during early spring. **Limnology and Oceanography**, Grafton, v. 43, p. 607-617, 1998.

MEDAU, R. **Diversidade de bactérias *Burkholderia* em solo de Terra Preta Arqueológica da Amazônia por análise em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) e seqüenciamento**. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MIDDELBURG, J.J.; NIEUWENHUIZE, J.; SLIM, F.J.; OHOWA, B. Sediment biogeochemistry in a East African mangrove Forest (Gazi Bay, Kenya). **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 34, n. 3, p. 133-155, 1996.

MOESENEDER, M.M.; WINTER, C.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) screening of a marine archaeal clone library to determine the different phylotypes. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 44, p. 159-172, 2001.

MUNSON, M.A.; NEDWELL, D.B.; EMBLEY, T.M. Phylogenetic diversity of Archaea in sediments samples from a coastal salt marsh. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4729-4733, 1997.

MUYZER, G.; STAMS, A.J.M.. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, p. 441-454, 2008.

NANSINGH, P.; JURAWAN, S. Environmental sensitivity of a tropical coastline (Trinidad, West Indies) to oil spills. **Spill Science & Technology Bulletin**, Oxford, v. 5, p. 161-172c, 1999.

NICOL, G.W.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 152-162, 2003.

NUNES, G.L. **Diversidade e estrutura de comunidades de *Bacteria* e *Archaea* em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

OVREAS, 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.

PAGALING, E.; HAIGH, R.D.; GRANT, W.D.; COWAN, D.A.; JONES, B.E.; MA, Y.; VENTOSA, A.; HEAPHY, S. Sequence analysis of an Archaeal virus isolated from a hypersaline lake in Inner Mongolia, China. **BMC Genomics**, London, v. 8, n. 410, 2007.

PERES-NETO, P.R.; LEGENDRE, P.; DRAY, S.; BORCARD, D. Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. **Ecology**, Washington, v. 87, p. 2614-2625, 2006.

PESARO, M.; WIDMER, F. Identification of novel Crenarchaeota and Euryarchaeota clusters associated with different depth layers of a forest soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 42, p. 89-98, 2002.

PEZESHKI, S.R.; DELAUNE, R.D.; MEEDER, J.F. Carbon assimilation and biomass partitioning in *Avicennia germinas* and *Rhizophora mangle* seedlings in response to soil redox conditions. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 37, n. 2-3, p. 161-171, 1997.

PIELOU, E.C. **The interpretation of ecological data** – a primer on classification and ordination. New York: John Wiley & Sons, 2000. 263 p.

PRESTON, C.M.; WU, K.Y.; MOLINSKI, T.F.; DeLONG, E.F. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: Cenarchaeon symbiosum gen. nov., sp. Nov. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 93, p. 6241-6246, 1996.

RANJARD, L.; POLY, F.; LATA, J.C.; MOUGUEL, C.; THIOLOUSE, J.; NAZARET, S. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4479-4487, 2001.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

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

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.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 6773-6779, 2006b.

SIBONI, N.; BEN-DOV, E.; SIVAN, A.; KUSHMARO, A. Global distribution and diversity of coral-associated *Archaea* and their possible role in the coral holobiont nitrogen cycle. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, p. 2979-2990, 2008.

SINGLETON, D.R.; MICHELLE A.F.; STEPHEN, L.R.A; WILLIAM, B.W. Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4374-4376, 2001.

TAKETANI, R.G.; DOS SANTOS, H.F.; ROSADO, A.S.; VAN ELSAS, J.D. Microbial community response to simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 2009. In press. Disponível em:
<<http://www.springerlink.com/content/647071u387x30575/fulltext.pdf>>. Acesso em: 2 jul. 2006.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 101, p. 11030-11035, 2004.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TESKE, A.P. Microbial communities of deep marine subsurface sediments: molecular and cultivation surveys. **Geomicrobiology Journal**, Philadelphia, v. 23, p. 357-386, 2006.

THIES, J.E. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 71, p. 579-591, 2007.

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.; GOKSØYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 3, p.782-787, 1990.

TSAI, S.M.; CANNAVAN, F.S.; SILVA JUNIOR, J.P.; CHAVES, M.G.; PASSIANOTO, C.C.; BORGES, C.P. Diversidade bacteriana em terra preta de índio baseada em seqüenciamento do gene 16S rRNA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: SBCS, 2003. 1 CD-ROM.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M.E.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p. 460-468, 2000.

VETRIANI, C.; JANNASCH, H.W.; MacGREGOR, B.J.; STAHL, D.A.; REYSENBACH, A.L. Population structure and Phylogenetic characterization of marine benthic *Archaea* in deep-sea sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4375-4384, 1999.

WICKRAMASINGHE, S.; BORIN, M.; KOTAGAMA, S.; COCHARD, R.; ANCENO, A.J.; SHIPIN, O.V. Multi-functional pollution mitigation in a rehabilitated mangrove conservation area. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 35, p. 898-907, 2009.

WIECZOREK, A. **Mapeamento de sensibilidade a derramamentos de petróleo do Parque Estadual da Ilha do Cardoso – PEIC e áreas do entorno**. 2006. 157 p. Dissertação (Mestrado em Geociências e Meio Ambiente) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2006.

WOODWELL, G.M.; WHITNEY, D.E.; HALL, C.A.S.; HOUGHTON, R.A. The flax pond ecosystem study: Ex changes of carbon in water between a salt marsh a long island sound. **Limnology and Oceanography**, Grafton, v. 22, n. 5, p. 833-938, 1977.

YAN, B.; HONG, K.; YU, Z.N. Archaeal communities in mangrove soil characterized by 16S rRNA gene clones. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 44, n. 5, p. 566-571, 2006.

YUN, T.; YUAN-RONG, L.; TIAN-LING, Z.; LI-ZHE, C.; XIAO-XING, C.; CHONG-LING, Y. Contamination and potential biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments of Xiamen, China. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 56, p. 1184-1191, 2008.

ZHANG, G.; DONG, H.; XU, Z.; ZHAO, D.; ZHANG, C. Microbial diversity in ultra-high-pressure rocks and fluids from the Chinese Continental Scientific Drilling Project in China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 3213-3227, 2005.

ZHOU, J.; XIA, B.; TREVES, D.S.; WU, L.Y.; MARSH, T.L.; O'NEILL, R.V.; PALUMBO, A.V.; TIEDJE, J.M. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 86, p. 326-334, 2002.