UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

Diversidade de arquéias e bactérias envolvidas na ciclagem do nitrogênio em sedimentos de manguezais

ARMANDO CAVALCANTE FRANCO DIAS

Piracicaba

2012

ARMANDO CAVALCANTE FRANCO DIAS

Diversidade de arquéias e bactérias envolvidas na ciclagem do nitrogênio em sedimentos de manguezais

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de são Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Dini Andreote

Piracicaba

2012

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

Dias, Armando Cavalcante Franco
Diversidade de arquéias e bactérias envolvidas na ciclagem do nitrogênio em sedimentos de manguezais / Armando Cavalcante Franco Dias; orientador João Lúcio de Azevedo; co-orientador Fernando Dini Andreote. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2011.
98 p.: il.

Tese (Doutorado – 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. Biodiversidade 2. Ciclos biogeoquímicos 3. Ecologia microbiana 4. Reação em cadeia por polimerase I. Título

CDU 579.266.2 : 631.461.5

Ao meu pai Oraldo Gabriel Dias e a minha mãe Solange M. C. F. Dias (*in memorian*), a minha irmã Aline M. C. F. Dias e a minha sobrinha Rafaela C. F. D. Bruzadelli e Familiares.

Dedico.

Ao meu amigo Fernando D. Andreote, e minha amiga Cristiane C. F. Fasanella e aos seus filhos Giovanni F. Andreote e Fellipe C. Fasanella e a Simone Raposo Cotta minha namorada e companheira.

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, ao meu anjo da guarda e a minha família;

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pela orientação, confiança e pela oportunidade de aprendizagem e crescimento acadêmico e profissional;

Ao Fernando Dini Andreote pela orientação, amizade e ensinamentos durante minha pós-graduação (valeu Moska);

Ao Dr. Jan Dirk van Elsas pela orientação durante o período no exterior;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro;

Aos amigos com participação especial neste trabalho: Fábio L. S. Jr (Dig), Cristiane C Fasanella (Kit), Danice M. Luvizotto (Metal), Francisco D. Andreote (Fran), Carlos Vildoso (Carlão), Marcus Vinicius (Polé), Júlia Lima e Simone Raposo Cotta (Garotilda);

A todos os companheiros e amigos do Departamento de Ciência do Solo e Genética da ESALQ, da Embrapa Meio Ambiente e do Centro de Energia Nuclear na Agricultura;

Aos amigos do laboratório em Gronigen na Holanda, onde fiz parte do meu doutorado e em especial a Michele de Cassia Pereira e Silva;

A aluna Maryeimy Varon Lopez, orientada pelo Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, que desenvolve projeto na mesma área, dentro do qual obteve os dados de pirosequenciamento;

Á bibliotecária Marilia Garcia Henyei, pela revisão da tese;

Enfim, a todos que estiveram presentes e participaram de alguma forma neste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

"Torna-te aquilo que és."

Friedrich Nietzsche

RESUMO

DIAS, A. C. F. **Diversidade de arquéias e bactérias envolvidas na ciclagem do nitrogênio em sedimentos de manguezais**. 2012. 98 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

O manguezal é um ecossistema costeiro, localizado em regiões de interface entre os ambientes terrestre e marinho, de ocorrência exclusiva em zonas tropicais e subtropicais. Esta localização confere ao sedimento deste ambiente características únicas, como alta salinidade e baixa disponibilidade de oxigênio, associado a grande riqueza em matéria orgânica. O resultado destas condições é a ocorrência de uma restrita diversidade de plantas em tais ambientes, associada a uma grande diversidade de animais, que usam o manguezal para sua proteção e reprodução. O presente estudo mostrou como as comunidades de arquéias (*amo*A e 16S DNAr) e bactérias (*nif*H e 16S DNAr) estão estruturadas em sedimentos de manguezais sob distintos estados de preservação. Os perfis de DGGE indicaram alterações na composição das comunidades alvo, ligando sua estruturação com a contaminação do ambiente, enquanto que as quantificações de tais genes por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) indicaram alterações apenas na comunidade de arquéias oxidadoras de amônio. A filogenia destes grupos revelou a presença de grupos comumente encontrados em solos e água, alem de grupos particulares, possivelmente relacionado ao processo de especiação no ambiente de manguezal. De maneira geral, os resultados indicam que as comunidades de arquéias e bactérias são responsivas ao estado de contaminação dos manguezais, o que pode gerar um processamento diferencial do nitrogênio nestes sedimentos.

Palavras-chave: Ecologia microbiana. PCR-DGGE. qPCR. Pirosequenciamento.

ABSTRACT

DIAS, A. C. F. **Diversity of archaea and bacteria involved in the nitrogen cycling in mangrove sediments**. 2012. 98 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

The mangrove is a coastal ecosystem, located in the interface regions between the land and sea environments, with exclusive occurrence in tropical and subtropical areas. Such location confers to the mangrove sediments unique characteristics, like as high salinity and low availability of oxygen, associated with the high abundance of organic matter. The result of these conditions is the occurrence of a restrict plant diversity, associated with a great diversity of animals, who use the mangroves for its protection and reproduction. The present study has shown how the communities of archaea (16S DNAr and *amo*A) and bacteria (16S DNAr and *nif*H) are structured in mangrove soils under distinct states of preservation. The DGGE patterns indicate alterations in the composition of targeted communities, linking its structure with the environmental contamination, while the quantifications of targeted genes by real time PCR (qPCR) has indicated alterations only in the community of ammonium oxidizers archaea. The phylogeny of these groups revealed the presence of groups commonly found in soils and water samples, besides the occurrence of particular groups, possibly resulted from a speciation process in the mangrove environment. In general, results indicated that archaeal and bacterial communities are responsive to the mangroves contamination, and its alteration can also lead to differential nitrogen processing in these soils.

Key-words: Microbial ecology. PCR-DGGE. qPCR. Pyrosequencing.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO DA LITERATURA..... 16
2.1 Diversidade microbiana em manguezais 16
2.2 Diversidade de arquéias e bactérias em manguezais..... 18
2.3 Grupos envolvidos no ciclo do nitrogênio em manguezais 20
REFERÊNCIAS 24
3 DIVERSIDADE DE ARQUÉIAS OXIDADORAS DE AMÔNIO EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS 30
Resumo 30
Abstract 31
3.1 Introdução..... 32
3.2 Desenvolvimento 33
3.2.1 Material e Métodos 33
3.2.1.1 Manguezais e amostras avaliadas..... 33
3.2.1.2 Extração de DNA das amostras de sedimento 37
3.2.1.3 Análise dos genes de interesse por qPCR..... 37
3.2.1.4 Análise das comunidades de arquéias do sedimento de manguezais por meio de DGGE 38
3.2.1.5 Determinação das variáveis ambientais significativas na diversidade microbiana..... 39
3.2.1.6 Construção e análise de biblioteca de clones dos genes de interesse 40
3.2.1.7 Análise da comunidade de arquéias por meio do sequenciamento parcial do gene 16S DNAr via pirosequenciamento..... 41
3.3 Resultados..... 42
3.3.1 Quantificação das comunidades alvo por PCR em tempo real 42
3.3.2 Análise dos perfis das comunidades de arquéias por DGGE 44
3.3.3 Análise dos fatores ambientais na composição das comunidadesmicrobianas 47
3.3.4 Determinação da filogenia de arquéias nos manguezais avaliados por sequenciamento de clones 48
3.3.5. Dados ecológicos obtidos das bibliotecas de clones analisadas 50
3.3.6 Determinação da filogenia de arquéias nos manguezais avaliados por pirosequenciamento 52
3.4 Discussão 54
3.5 Conclusões..... 58

Referências 59
4 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS TOTAIS E FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS 62
Resumo 62
Abstract 63
4.1 Introdução 64
4.2 Desenvolvimento 65
4.2.1 Material e Métodos 65
4.2.1.1 Manguezais e amostras avaliadas 65
4.2.1.2 Extração de DNA das amostras de sedimento 66
4.2.1.3 Quantificação do gene *nif*H por PCR em tempo real 67
4.2.1.4 Análise das comunidades de bactérias totais e fixadores de nitrogênio nos sedimentos de manguezais por meio de DGGE 68
4.2.1.5 Análise dos resultados dos DGGEs baseados nos genes 16S DNAr e *nif*H 69
4.2.1.6 Análise da comunidade de bactérias por meio do pirosequenciamento parcial do gene16S DNAr 70
4.2.1.7 Construção e análise de biblioteca de clones dos gene *nif*H 71
4.3 Resultados 72
4.3.1 Quantificação do gene *nif*H por qPCR em tempo real em amostras de sedimentos de manguezais 72
4.3.2 Análise do perfil das comunidades de bactérias totais e fixadoras de nitrogênio por PCR-DGGE 73
4.3.3 Determinação da filogenia de bactérias nos sedimentos dos manguezais avaliados 77
4.3.4 Determinação da filogenia dos genes *nif*H encontrados nos sedimentos dos manguezais avaliados 80
4.4 Discussão 85
4.5 Conclusões 89
Referências 90
ANEXO 93

1 INTRODUÇÃO

Os manguezais são áreas localizadas nas planícies de inundação das marés em áreas tropicais e subtropicais, compondo um dos ambientes naturais mais degradados no Brasil, onde ocorre uma das maiores extensões de manguezais do mundo, que se estende desde o Cabo Orange no Amapá, até o município de Laguna em Santa Catarina, abrangendo uma área de 25.000 Km^2.

Os solos de manguezais, também chamados de sedimentos, são predominantemente anaeróbicos devido à frequente inundação pelas marés. Dessa forma, embora ecossistemas de manguezais sejam ricos em matéria orgânica, estes são deficientes em nutrientes, devido à baixa taxa de decomposição de compostos orgânicos em condições limitantes de oxigênio. Neste ponto, surge a importância dos micro-organismos, que têm papel fundamental na manutenção dos ciclos vitais neste ambiente, atuando na ciclagem de nutrientes, e dando suporte ao desenvolvimento dos demais organismos neste ecossistema, em especial as plantas.

No entanto, as frações funcionais da comunidade microbiana presente nos manguezais ainda não foram avaliadas de maneira extensa, o que tem se tornado possível com o desenvolvimento das metodologias independente de cultivo, que permitem tanto uma análise focada em genes ribossomais (por exemplo o 16S DNAr), como em genes relacionados a determinados processos, como por exemplo, a fixação biológica do nitrogênio (gene *nif*H), ou a nitrificação (gene *amo*A).

Dessa forma, este trabalho descreve a diversidade de bactéria e arquéias em solos de manguezais sob distintos estados de preservação, e infere na estruturação das comunidades de bactérias fixadoras de nitrogênio, e de arquéias oxidadoras de amônio neste ambiente ainda pouco estudado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diversidade microbiana em manguezais

O ecossistema de manguezais apresenta-se amplamente distribuído, cobrindo cerca de 60 a 75% da linha costeira mundial. O Brasil, a Indonésia e a Austrália são os países mais abundantes em ecossistemas de manguezais (HOLGUIN et al., 2001). A importância deste ecossistema reside na grande produtividade biológica, com alta diversidade de peixes, crustáceos, moluscos, aves, répteis e mamíferos. Toda esta diversidade exige uma alta disponibilidade de nutrientes no início da cadeia trófica, onde surge a importância da atividade microbiana, que é a principal responsável pelos processos de decomposição da matéria orgânica e de fixação de nutrientes neste ambiente (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001; DUKE et al., 2007). As bactérias e arquéias estão envolvidas em processos de transformação de compostos essenciais e também se responsabilizam pela maior parte do fluxo de carbono em sedimentos de manguezais (HOLGUIN et al., 2001).

Apesar de possuir muita matéria orgânica, os ecossistemas de manguezal sofrem por deficiência de alguns nutrientes, especialmente o nitrogênio e o fósforo. A alta taxa de suprimento desses nutrientes está relacionada à atividade microbiana, que em manguezais transformam a vegetação morta em fontes de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes que podem ser usados pelas plantas (BASHAN; HOLGUIN, 2002). Assim, as bactérias estão envolvidas em processos de transformação de nutrientes (e.g. fixação biológica do nitrogênio, amonificação, nitrificação e denitrificação), e também são responsáveis pela maior parte do fluxo de carbono em sedimentos de manguezais tropicais (HOLGUIN et al., 2001; TAKETANI et al., 2010). Dessa forma, temos que nos manguezais ocorre uma interdependência entre micro e macro-organismos, onde os macro-organimos dependem dos micro-organismos para a reciclagem de nutrientes, e os micro-organismos se beneficiam pela absorção de fontes de carbono oferecidas principalmente pela vegetação (HOLGUIN et al., 2001; 2006). É possível formular a hipótese de que na ausência ou redução da microbiota, haverá prejuízo nas atividades comerciais e ecológicas, e possivelmente a destruição dos ecossistemas de manguezais (HOLGUIN et al., 2001; 2006). Portanto, o conhecimento das comunidades microbianas dos

manguezais é de grande relevância para entender melhor a dinâmica desse ecossistema, destacando sua preservação e manutenção.

A vegetação de mangue na costa brasileira, que engloba a região pesquisada, é predominantemente representada pelas espécies *Laguncularia racemosa* (mangue branco), *Avicennia schaueriana* (mangue preto) e *Rhizophora mangle* (mangue vermelho) (DIAS et al., 2012[1]). O papel destas plantas sobre a atividade microbiana é ainda pouco explorado em sedimentos de manguezais da costa do Estado de São Paulo, como nas cidades de Bertioga e Cananéia que possuem grandes extensões de áreas de manguezais (Figura 2.1). No entanto, sabe-se que o efeito rizosférico é presente em tal ambiente, e pode selecionar grupos microbianos específicos, a partir da microbiota dos solos de manguezais, para se associar às raízes, e possivelmente suportar o desenvolvimento das espécies vegetais em tal ambiente (ARFI et al., 2012; CLEARY et al., 2012).

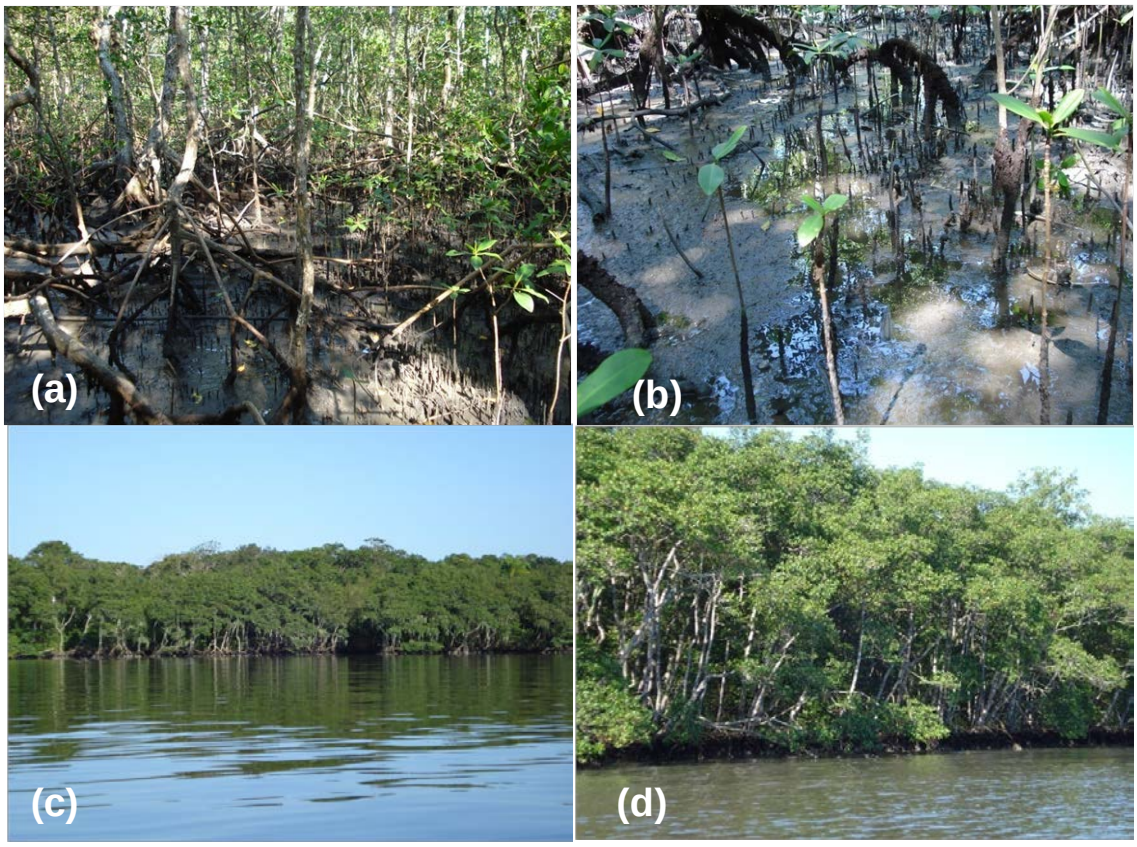


Figura 2.1 - Fotos dos manguezais de Bertioga e da Ilha do Cardoso - Cananéia. (a) manguezal de Bertioga sem derramamento de óleo; (b) manguezal de Bertioga com derramamento de óleo a); (c/d) manguezal da Ilha do Cardoso – Cananéia

[1] DIAS, A.C.F.; TAKETANI, R.G.; ANDREOTE, F.D.; LUVIZOTTO, D.M.; SILVA, J.L.; NASCIMENTO, R.S.; SOARES, I.M. Interspecific variation of the bacterial community structure in the phyllosphere of the three major plant components of mangrove forests. **Brazilian Journal of Microbiology,** São Paulo, v. 43, 2012. No prelo.

2.2 Diversidade de arquéias e bactérias em manguezais

Dentre os organismos vivos, os micro-organismos representam a maior parte da diversidade biológica, englobando dois dos três domínios filogenéticos com exclusividade (Bacteria e Archaea), além de englobar os fungos, pertencentes ao domínio Eukarya.

O grupo das arquéias foi reconhecido filogeneticamente em 1977 (WOESE; FOX, 1977) e definido como Domínio separado das bactérias em 1990 (WOESE et al., 1990). Inicialmente, este domínio foi composto e descrito como um ramo filogenético ligado a micro-organismos que habitam ambientes extremos (lagos salinos, fontes termais, locais com extremos de pH, dentre outros). No entanto, atualmente reconhecem-se, devido principalmente às técnicas independentes de cultivo, a ampla ocorrência de tais organismos nos mais diversos ambientes, como lagos, oceanos e solos (DELONG; PACE, 2001). As arquéias representam uma fração considerável da diversidade de micro-organismos em ecossistemas marinhos e terrestres, sendo importantes nos ciclos biogeoquímicos globais (DELONG, 2006). Apesar da ampla distribuição das arquéias nos ambientes terrestres, grupos específicos são encontrados em locais geográficos e ecossistemas que possuem características geoquímicas particulares (SCHLEPER et al., 2005).

A maioria das linhagens de arquéias conhecida foi descrita por aproximações filogenéticas moleculares, principalmente devido ao fato de que ainda permanecem dificuldades de cultivo da maioria destes micro-organismos (SCHLEPER et al., 2005). Com base na análise da sequência do RNA ribossômico (RNAr), o domínio Archaea consiste de cinco filos distintos: Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota, Nanoarchaeota e Thaumarchaeota (SPANG, 2010). Em Crenarchaeota existem espécies aeróbias e anaeróbias com ampla diversidade fisiológica e são conhecidas como hipertermófilas, enquanto que em Euryarchaeota predominam as espécies tolerantes as outras adversidades ambientais, sendo neste filo alocadas as arquéias metanogênicas, halófilas extremas e termoacidófilas (BROCHIER-ARMANET et al., 2008). Membros de Korarchaeota já foram encontrados em vários ambientes, mas nenhuma espécie pôde ainda ser cultivada. Nanoarchaeota é o menor dos filos e seu único representante (*Nanoarchaeum equitans*) foi caracterizado como um micro-organismos simbionte restrito (ALLERS; MEVARECH, 2005). O filo Thaumarchaeota foi descrito recentemente, com base em

análises genômicas e de comparação filogenética entre três genomas de arquéias amônio oxidante oriundas de ambientes marinhos e termofílicos (KRUPOVIC, 2011). Genes de Thaumarchaeota, incluindo o 16S rRNA e os que codificam a enzima que participa da oxidação do amônio, têm sido detectados em diferentes ambientes, solos (LEININGER et al., 2006; TREUSCH et al., 2005), estuários, fontes termais terrestres e aquáticas (SPANG et al., 2010), o que evidência a participação ativa deste grupo microbiano no ciclo biogeoquímico do nitrogênio, especialmente na nitrificação.

Em manguezais tropicais, bactérias, arquéias e fungos constituem 91% da biomassa microbiana total (ALONGI et al., 1998). Nos últimos anos, o número de trabalhos focados no estudo da diversidade microbiana dos manguezais tem aumentado. Dentro deste contexto, Cury (2006) e Dias et al. (2010) mostraram que membros do domínio Bacteria estão presentes em abundância em sedimentos do manguezais, e parecem ter importante função na ciclagem de nutrientes e outros processos relacionados à manutenção da capacidade produtiva dos solos desse ecossistema. Com base nas metodologias independentes de cultivo alguns estudos abordaram a dinâmica, estrutura e composição de bactérias e genes funcionais nesse ecossistema.

Dias et al. (2010) estudaram a comunidade bacteriana presente em sedimentos do manguezal preservado da Ilha do Cardoso-Cananéia mostrando diferenças na estrutura de comunidades bacterianas, e descreveu como grupos importantes as classes Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e o filo Acidobacteria. De maneira similiar, Dias et al. (2012) investigou as comunidades de arquéias em sedimentos de manguezais, mostrando que estes grupos são abundantes, e responsivos ao histórico de preservação dos manguezais.

Ainda dentro desta temática, alguns trabalhos têm descrito a composição de comunidades microbianas na rizosfera de plantas tipicamente encontradas nos manguezais (ARFI et al., 2012; CLEARY et al., 2012), descrevendo alterações causadas pela contaminação dos manguezais com petróleo (SANTOS et al., 2011a) e o potencial biotecnológico de bactérias isoladas do sedimento de manguezal (DIAS et al., 2009). Recentemente, Dias et al. (2012) investigaram amostras do filoplano de espécies arbóreas que ocorrem nos manguezais brasileiros, mostrando que bactérias são selecionadas pela salinidade e localidade nas folhas das árvores alocadas em diferentes porções dos manguezais.

Em relação ao histórico de preservação dos manguezais, alguns estudos apontam que a perturbação antrópica e/ou industrial tem efeito direto na composição desta microbiota (GOMES et al., 2008). Mais especificamente, Santos et al. (2011a) demonstrou que o aumento da contaminação de solos de manguezais leva a uma seleção da comunidade bacteriana, representada pelo incremento nas populações de *Marinobacterium*, *Marinobacter* e *Cycloclasticus*. Tais alterações podem também ser observadas em frações funcionais da comunidade, como demonstrado para a densidade e estrutura da comunidade bacteriana, analisada com base no gene *nif*H, em solos de manguezais submetidos a contaminação por petróleo (TAKETANI et al., 2009).

No entanto, ainda necessita-se de estudos que visem à descrição da funcionalidade da microbiota dos manguezais, bem como acessem as alterações sobre cada porção funcional da comunidade devido a estes fatores analisados em outros estudos.

2.3 Grupos envolvidos no ciclo do nitrogênio em manguezais

A entrada do nitrogênio em manguezais é comumente associada à decomposição de matéria orgânica (sementes, folhas e casca de árvores). No entanto, em ambientes marinhos que acumulam matéria orgânica biodegradável como os manguezais, podem se observar também altas taxas de fixação biológica do nitrogênio (HOLGUIN et al., 1999).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) consiste no processo intermediado por micro-organismos diazotróficos, que transformam o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3) de duas maneiras distintas, na associação de bactérias com as plantas, ou em bactérias de vida livre (DIALLO et al., 2004). A capacidade de um micro-organismo fixar nitrogênio seja em associação ou não com as plantas está ligada à presença e atividade do complexo enzimático conhecido como nitrogenase, que tem como centro funcional a combinação das proteínas codificadas pelos genes chamados *nif* (RAIMOND et al., 2004; PEREIRA et al., 2011).

A FBN é catalisada pela enzima nitrogenase que requer ferro e molibdênio como co-fatores. A reação resultante é altamente exergônica, com elevada energia de ativação, a qual é inibida na presença de oxigênio (CANFIELD, 2010). Nesse processo, os genes *nif* são responsáveis pela codificação de subunidades da

nitrogenase que são altamente conservadas, os quais são encontrados nos micro-organismos fixadores de nitrogênio (FALKOWSKI; FENCHEL; DELONG, 2008). Entre os genes *nif* estão os genes *nif*D, *nif*H e *nif*K, que são todos codificadores das proteínas do complexo nitrogenase (SARITA et al., 2008). O complexo nitrogenase é composto por duas unidades básicas: uma ferro-proteína, que coleta a força redutora e a energia; e uma proteína ferro-molibdênio, que coleta e reduz o substrato (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A filogenia obtida a partir de genes *nif* mostrou ser similar à obtida pela filogenia baseada no gene 16S RNAr e, por isso, o gene *nif*, passou a ser utilizado para a caracterização da diversidade de bactérias diazotróficas (ZEHR et al., 2003). Dessa forma, pode-se basear um estudo da comunidade fixadora de nitrogênio na detecção, quantificação e análise da diversidade de tal gene (TAKETANI et al., 2009; PEREIRA et al., 2011).

Em manguezais, a fixação de nitrogênio foi avaliada em ambiente de mesocosmo, mostrando que a contaminação induzida por petróleo selecionou grupos microbianos, alterando a estrutura da comunidade bacteriana, e também alterando a abundância de genes *nif*H (TAKETANI et al., 2009) Flores-Mireles et al. (2007), por meio da análise de genes relacionados a fixação de nitrogênio, mostraram a dinâmica da comunidade diazotrófica na rizosfera de plantas típicas de manguezais. Recentemente, Liu et al. (2012), também acessando genes relacionados a este processo em amostras de rizosfera de *Cerbera manghas*, *Acanthus ilicifolius* L. e *Pongamia pinnata* na China, sugeriu a ocorrência de novos grupos filogenéticos do gene *nif*H em manguezais.

Outra importante transformação do nitrogênio é a nitrificação. Esta transformação, realizada via oxidação da amônia, é o primeiro e limitante passo da transformação da amônia em nitrato, via nitrito, sendo essencial para a ciclagem do nitrogênio no ambiente. As espécies microbianas capazes de realizar esta etapa da ciclagem do nitrogênio são denominadas de bactérias oxidadoras de amônio (AOB – *ammonia-oxidizing bacteria*) e arquéias oxidadoras de amônio (AOA - *ammonia-oxidizing archaea*). Utilizando técnicas de estudo independentes de cultivo é possível estudar as populações de AOB utilizando como alvo o gene que codifica a subunidade α da enzima amônio monoxigenase, o gene *amo*A (ROTTHAUWE et al., 1997). Recentemente, muitos estudos forneceram evidências de que a oxidação da amônia é também realizada no ambiente, por arquéias do filo Thaumarchaeota (AOA), que compõem uma das maiores populações microbianas

aquáticas, sendo estimada a presença de 10^{28} células deste ramo filogenético no oceano (KARNER; DELONG; KARL et al., 2001; LEHTOVIRTA et al., 2009; SPANG et al., 2010). As evidências desta funcionalidade vêm de estudos metagenômicos, onde um fragmento de 43kb clonado a partir de DNA extraído de amostras do mar do Sargasso apresentou sequências homólogas a genes *amo* e ao gene 16S ribossomal, o que permitiu a afiliação do fragmento, identificado como pertencente ao domínio Archaea (TREUSCH et al., 2005; VENTER et al., 2004). Adicionalmente, a análise por meio de cultivo da espécie *Nitrosopumilus maritimus* mostrou que esta arquéia é capaz de oxidar amônia, e apresenta sequências homólogas aos genes *amo*A, *amo*B e *amo*C (KONNEKE et al., 2005).

Existem controvérsias quanto às condições predominantes para uma maior atividade de AOA ou AOB na oxidação do NH_4^+ nos solos e água. Vários estudos têm sugerido que a oxidação do NH_4^+ no solo é impulsionado primordialmente por AOA (TOURNA et al., 2008), enquanto outros apontam que este processo é impulsionado por AOB (JIA; CONRAD, 2009). No entanto, tais comunidades se encontram em equilíbrio no solo e água, sendo distinta a funcionalidade uma da outra devido aos fatores ambientais, tais como o pH (NICOL et al., 2008), salinidade (MOSIER; FRANCIS, 2008), concentração de metais pesados (LI et al., 2009, MERTENS et al., 2009) e solos com diferentes cultivares de batata (DIAS et al., 2012). Segundo Di et al. (2010), as arquéias e bactérias amônio oxidantes atuam diferencialmente sob diferentes concentrações de nitrogênio no ambiente, principalmente na forma de amônia. Dentro deste contexto, as AOB são favorecidas pela alta disponibilidade de nutrientes no solo, enquanto que as AOA preferem ambientes oligotróficos, ou seja, com baixa disponibilidade de nutrientes (VALENTINE, 2007; ERGUDER et al., 2009). Este tipo de análise onde tais grupos são estudados ainda está por ser feito em diversos ambiente, como por exemplo, nos sedimentos de manguezais.

Após a oxidação da amônia ocorre o processo de desnitrificação, que consiste na redução do nitrato (NO_3^-) para nitrogênio atmosférico (N_2). Esta reação está associada com a liberação de óxido nítrico (NO) e de óxido nitroso (N_2O). Este processo é de grande importância econômica e ambiental, por ser responsável por perdas de adubação nitrogenada e por liberar óxido nitroso, que degrada a camada de ozônio na estratosfera (ZUMF, 1997; PHILIPPOT, 2002; KRAFT; STROUS; TEGETMEYER, 2010). A reação central da denitrificação é catalisada por duas

nitrato redutases (Nir) distintas, uma codificada pelo gene *nir*S que se liga ao citocromo *cd1*, e outra codificada pelo gene *nir*K que atua de maneira dependente de cobre. A atividade destas enzimas resulta na formação do óxido nitroso, que é o substrato onde atua a enzima codificada pelo gene *nos*Z, que transforma o óxido nitroso em nitrogênio atmosférico (N_2) (PHILIPPOT; HALLIN, 2005).

Além da desnitrificação, o nitrato do solo pode ser absorvido pelas plantas e micro-organismos, ou então transformado em diferentes compostos; em amônio via redução dissimilatória do nitrato (DNRA), ou em N_2 via o processo de oxidação anaeróbica da amônia (*anammox*). O processo de anammox foi descrito como sendo a etapa que faltava a ser desvendada no ciclo do nitrogênio (MULDER et al., 1995; DEVOL, 2003). Por ser um fenômeno anaeróbio, este tipo de reação é predominante em ambientes com limitadas concentrações de oxigênio. Analisando os micro-organismos promotores do processo de *anammox*, são conhecidos quatro gêneros bacterianos, todos estes candidatos e não cultivados, que estão relacionados com tal atividade; Candidatus *Scalindua*, Candidatus *Brocadia*, Candidatus *Kuenenia* e Candidatus *Anammoxoglobus* (SCHMID et al., 2005) No entanto, a real dimensão dos grupos bacterianos associados a esta função nos mais diversos ambiente, encontra-se pouco descrita, o que faz esta lista crescente e dinâmica em cada nova publicação nesta área. Este grupo microbiano ainda não foi devidamente estudado nos ambientes de manguezal, onde condições propícias para sua ocorrência e funcionamento podem ser encontradas.

REFERÊNCIAS

ALLERS, T.; MEVARECH, M. Archaeal genetics-the third way. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 6, n. 1, p. 58–73, 2005.

ALONGI, D. M. **Coastal ecosystem processes**. New York: CRC Press, 1998. 419 p.

ARFI, Y.; BUÉE, M.; MARCHAND, C.; LEVASSEUR, A.; RECORD, E. Multiple markers pyrosequencing reveals highly diverse and host-specific fungal communities on the mangrove trees *Avicennia marina* and *Rhizophora stylosa*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amstedam, v. 79, p. 433–444, 2012.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. **Trees: Structure and Function**, Heidelberg, v. 16, p. 159-166, 2002.

BROCHIER-ARMANET, C.; BOUSSAU, B.; GRIBALDO, S.; FORTERRE, P. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, p. 245–252, 2008.

CANFIELD, D.; GLAZER, A. N.; FALKOWSKI, P. D. The evolution and future of earth's nitrogen cycle. **Science**, Washington, DC, v. 330, p. 192–196, 2010.

CLEARY, D. F. R.; SMALLA, K.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; GOMES, N. C. M. Assessment of variation in bacterial composition among microhabitats in a mangrove environment using DGGE fingerprints and barcoded pyrosequencing. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 1, e29380, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0029380.

CURY, J. C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado por petróleo**. 2002. 84 f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

DELONG, E. F.; PACE, N. R. Environmental diversity of bacteria and archaea. **Systematic Biology,** Washington, DC, v. 50, p. 470-478, 2001.

DELONG, E. F. Archaeal mysteries of the deep revealed. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 103, p. 6417-6418, 2006.

DEVOL, A. H. Nitrogen cycle—solution to a marine mystery. **Nature**, London, v. 422, p. 575–576, 2003.

DI, H. J.; CAMERON, K. C.; SHEN, J. P.; WINEFIELD, C. S.; O'CALLAGHAN, M.; BOWATTE, S.; HE, J. Z. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 72, p. 386–394, 2010.

DIALLO, M. D.; WILLEMS, A.; VLOEMANS, N.; COUSIN, S.; VANDEKERCKHOVE, T. T.; DE LAJUDIE, P.; NEYRA, M.; VYVERMAN, W.; GILLIS, M.; VAN DER GUCHT, K. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N2-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. Raddiana and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 400–415, 2004.

DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D.; DINI-ANDREOTE, F.; LACAVA, P. T.; SÁ, A. L. B.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 1305–1311, 2009.

DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D.; RIGONATO, J.; FIORE, M. F.; MELO, I. S.; ARAÚJO, W. L. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 98, p. 541–551, 2010.

DIAS, A. C. F.; DINI-ANDREOTE, F.; TAKETANI, R. G.; TSAI, S. M.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S.; ANDREOTE, F. D. Archaeal communities in three contrasting mangrove sediments. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 11, p. 1466–1476, 2011.

DIAS, A. C. F.; HOOGWOUT, E. F.; SILVA, M. C. P.; SALLES, J. F.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Potato cultivar type affects the structure of ammonia oxidizer communities in field soil under potato beyond the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 50, p. 85-95, 2012.

DUKE, N. C.; MEYNECKE, J. O.; DITTMANN, S. A world without mangroves? **Science**, Washington, DC, v. 317, p. 41–42, 2007.

ERGUDER, T. H.; BOON, N.; WITTEBOLLE, L.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 33, p. 855–869, 2009.

FALKOWSKI, P. G.; FENCHEL, T.; DELONG, E. F. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. **Science**, Washington, DC, v. 320, p. 1034–1038, 2008.

FLORES-MIRELES, A. L.; WINANS, S. C.; HOLGUIN, G. Molecular characterization of diazotrophic and denitrifying bacteria associated with mangrove roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 73, p. 7308–7321, 2007.

GOMES, N. C. M.; BORGES, L. R.; PARANHOS, R.; PINTO, F. N.; MENDONÇA-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.

HOLGUIN, G.; ZAMORANO, P. G.; BASHAN, L. E. D.; MENDOZA, R.; AMADOR, E.; BASHAN, Y. Mangrove health in an arid environment encroached by urban development — a case study. **The Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 363, p. 260–274, 2006.

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**, Berlin, v. 33, p. 265-278, 2001.

HOLGUIN, G. B. Y.; MENDOZA-SALGADO, R.; AMADOR, E.; TOLEDO, G.; VÁZQUEZ, P.; AMADOR, A. La microbiología de los manglares. Bosques en la frontera entre el mar y la tierra. **Ciencia y Desarrollo**, Mexico, DF, v. 144, p. 26-35, 1999.

JIA, Z. J.; CONRAD, R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 11, p. 1658–1671, 2009.

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.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, London, v. 40, p. 81–251, 2001.

KONNEKE, M.; BERNHARD, A. E.; DE LA TORRE, J. R.; WALKER, C. B.; WATERBURY, J. B.; STAHL, D. A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature**, London, v. 437, p. 543-546, 2005.

KRAFT, B.; STROUS, M.; TEGETMEYER, H.E. Microbial nitrate respiration – genes, enzymes and environmental distribuition. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 155, p. 1-14, 2011.

KRUPOVIC, M.; SPANG, A.; GRIBALDO, S.; FORTERRE, F.; SCHLEPER, C. A thaumarchaeal provirus testifies for an ancient association of tailed viruses with archaea. **Biochemical Society Transactions**, Essex, v. 39, p. 82–88, 2011.

KUENEN, J. G. Anammox bacteria: from discovery to application. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, p. 320–326, 2008.

LEININGER, S.; URICH, T.; SCHLOTER, M.; SCHWARK, L.; QI, J.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I.; SCHUSTER, S.C.; SCHLEPER, C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, London, v. 442, p. 806-809, 2006.

LEHTOVIRTA, L. E.; PROSSER, J. I.; NICOL, G. W. Soil pH regulates the abundance and diversity of group 1.1c Crenarchaeota. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 70, p. 367–376, 2009.

LI, C. H.; ZHOU, H. W.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Vertical distribution and anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments in Hong Kong, South China. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 21, p. 5772–5779, 2009.

LIU, J.; PENG, M.; LI, Y. Phylogenetic diversity of nitrogen-fixing bacteria and the *nif*H gene from mangrove rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 58, p. 531–539, 2012.

MERTENS, J.; BROOS, K.; WAKELIN, S. A.; KOWALCHUK, G. A.; SPRINGAEL, D.; SMOLDERS, E. Bacteria, not archaea, restore nitrification in a zinc-contaminated soil. **ISME Journal**, New York, v. 3, p. 916-923, 2009.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MOSIER, A. C.; FRANCIS, C. A. Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 10, p. 3002–3016, 2008.

MULDER, A.; VANDEGRAAF, A. A.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized-bed reactor. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 16, p. 177–183, 1995.

NICOL, G. W.; LEININGER, S.; SCHLEPER, C.; PROSSER, J. I. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidising archaea and bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 10, p. 2966–2978, 2008.

PEREIRA E SILVA, M. C.; SEMENOV, A. V.; VAN ELSAS, J. D.; SALLES, J. F. Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 77, p. 57–68, 2011.

PHILIPPOT, L. Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1577, p. 355–376, 2002.

PHILIPPOT, L.; HALLIN, S. Denitrifying bacteria: A model of functional community to find the missing link between diversity and activity. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 8, p. 1-6, 2005.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, p. 541-554, 2004.

ROTTHAUWE, J. H.; WITZEL, K. P.; LIESACK, W. The ammonia monooxygenase structural gene *amo*A as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, p. 4704-4712,1997.

SANTOS, H. F.; CARMO, F. L.; PAES, J. E.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 216, p. 329–350, 2011.

SARITA, S.; PRIEFER, U. B.; PRELL, J.; SHARMA, P. K. Diversity of *nif*H gene amplified from rhizosphere soil DNA. **Current Science**, Bangalore, v. 94, p. 109-114, 2008.

SCHMID, M. C.; MAAS, B.; DAPENA, A.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.; VAN DE VOSSENBERG, J.; KARTAL, B.; VAN NIFTRIK, L.; SCHIMIDT, I.; CIRPUS, I.; KUENEN, J. G.; WAGNER, M.; DAMSTÚ, J. S. S.; KUYPERS, M.; REVSBECH, N. P.; MENDEZ, R.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (*anammox*) bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, p. 1677–1684, 2005.

SCHLEPER, C.; JURGENS, G.; JONUSCHEIT, M. Genomic studies of uncultivated archaea. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 479–488, 2005.

SPANG, A.; HATZENPICHLER, R.; BROCHIER-ARMANET, C.; RATTEI, T.; TISCHLER, P.; SPIECK, E.; STREIT, W.; STAHL, D. A.; WAGNER, M.; SCHLEPER, C. Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 18, p. 331–340, 2010.

TAKETANI, R. G.; FRANCO, N. O.; ROSADO, A. S.; VAN ELSAS, J. D. Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. **Journal of Microbiology**, Seoul, Korea, v. 48, p. 7–15, 2010.

TAKETANI, R. G.; DOS SANTOS, H. F.; VAN ELSAS, J. D.; ROSADO, A. S. Characterization of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 96, p. 343–354, 2009.

TREUSCH, A. H.; LEININGER, S.; KLETZIN, A.; SCHUSTER, S. C.; KLENK, H.; SCHLEPER, C. Novel genes for nitrite reductase and Amo related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 1985–1995, 2005.

TOURNA, M.; FREITAG, T. E.; NICOL, G. W.; PROSSER, J. I. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 10, p. 1357–1364, 2008.

VALENTINE, D. L. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 316–323, 2007.

VENTER, J. C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J. F.; HALPERN, A. L.; RUSCH, D.; EISEN, J. A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K. E.; NELSON, W.; FOUTS, D. E.; LEVY, S.; KNAP, A. H.; LOMAS, M. W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKOCH, C.; YU-HUI ROGERS, Y.-H.; HAMILTON, O.; SMITH, H. O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, Washington, DC, v. 304, p. 66–74, 2004.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, DC, v. 74, p. 5088-5090, 1977.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Toward a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA,** Washington, DC, v. 87, p. 4576–4579, 1990.

ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 5, p. 539–554, 2003.

ZUMFT, W. G. Cell biology and molecular basis of denitrification. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 61, p. 533-616, 1997.

3 DIVERSIDADE DE ARQUÉIAS OXIDADORAS DE AMÔNIO EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS

RESUMO

Micro-organismos são responsáveis por diversos processos em diferentes ecossistemas. Entretanto, pouco se conhece sobre a diversidade filogenética e funcional de grupos microbianos no ecossistema de manguezal. Neste intuito, este capítulo utilizou análises independentes de cultivo para melhor descrever a diversidade filogenética (16S DNAr) e funcional (*amo*A) de grupos de arquéias envolvidos na oxidação do amônio em três manguezais do Estado de São Paulo. A análise de componentes principais, baseada nos perfis de DGGE, permitiu a comparação estrutural das comunidades de arquéias com base em ambos os genes avaliados. A quantificação dos genes alvo por qPCR indicou abundâncias similares de arquéias totais (16S DNAr), enquanto que alterações na quantidade de arquéias amônio-oxidantes (*amo*A) foram observadas, sendo detectado apenas no manguezal não contaminado de Bertioga, e na área livre do efeito do petróleo no manguezal contaminado de Bertioga. A análise de sequências do gene *amo*A indicou a presença dos dois domínios principais da filogenia deste gene nos manguezais (oriundos de amostras de água e solo). Em relação a diversidade total de arquéias, bibliotecas de clones do gene ribossomal 16S DNAr, e a análise de *amplicons* via pirosequenciamento, indicaram como grupos mais abundantes os filos Crenarchaeota (média de 48,6%) e Euryarchaeota (média de 42,6%), além de sequências afiliados a arquéias não classificadas (8,7%). Estes dados mostram ainda, que os manguezais abrigam grupos únicos de arquéias, dentre elas algumas com características amônio-oxidantes. Conclusivamente, os manguezais atuam como reservatórios de diversidade das arquéias que possivelmente estão envolvidas em transformação do nitrogênio e outros elementos no ecossistema, sendo tais comunidades afetadas por pressões causadas por atividades antrópicas.

Palavras-chave: 16SrRNA. Processamento de amônio. *amo*A. Thaumarchaeota.

ABSTRACT

Microorganisms are responsible for diverse processes in different ecosystems. However, little is known about the phylogenetic and functional microbial diversity in mangroves ecosystems. In this context, this chapter user culture-independent analysis to better describe the phylogenetic (16S DNAr) and functional (*amo*A) diversity of archaea involved in the ammonium oxidation in three mangroves located in the State of São Paulo. The principal components analysis, based on DGGE patterns, allowed the structural comparisons of archaeal communities based on both targeted genes. The quantification of targeted genes by qPCR indicated similar abundances of total archaea, while alterations were observed for ammonium-oxidizer archaea, being this group detected only in the non-contaminated mangrove at Bertioga, and in the area free of oil spill within the oil-affected mangrove in Bertioga. The sequence analysis of *amo*A genes indicated the presence of the two main domains of its phylogeny (from marine and soil samples). Concerning the total diversity of archaea, clone libraries of 16S DNAr, and amplicons sequencing by pyrosequencing, indicated as most abundant groups the phyla Crenarchaeota (average of 48.6%) and Euryarchaeota (average of 42.6%), besides archaeal unclassified sequences (average 8.7%). These data also show that mangroves harbor unique groups of archaea, among them, some ammonium-oxidizers. Concluding, the mangroves act as reservoirs of archaeal diversity which are possibly involved in the nitrogen transformations and other elements in this ecosystem, being this community affected by the pressures caused by anthropological activities.

Key-words: 16S rRNA. Ammonium processing. *amo*A. Thaumarchaeota.

3.1 Introdução

O manguezal constitui um ambiente único, que ocorre em regiões tropicais e subtropicais do planeta. Devido a sua localização, importância e alta susceptibilidade à degradação, estudos microbiológicos deste ecossistema são importantes e urgentes (DUKE, 2007). Apesar da ampla descrição de espécies de plantas e animais residentes em manguezais, os micro-organismos e genes presentes neste ecossistema foram pouco explorados (HOLGUIN et al., 2006). Porém, é conhecida a importância da comunidade microbiana na manutenção deste ecossistema, onde esta participa ativamente da ciclagem de nutrientes, por meio do processamento da matéria orgânica, suprindo nutricionalmente as plantas e animais que vivem nos manguezais.

Dessa forma, conhecer tal biodiversidade e entender como estes micro-organismos respondem às alterações ambientais presentes em diversos manguezais, ou mesmo em diferentes pontos dentro de um mesmo manguezal, pode auxiliar no melhor entendimento deste ecossistema, e dar suporte a projetos de pesquisa que visem a bioprospecção, com a busca de novas biomoléculas em manguezais (DIAS et al., 2009; FASANELLA et al., 2012).

Neste trabalho, técnicas independentes de cultivo, que evitam os problemas de seleção inerentes ao cultivo de arquéias a partir de amostras ambientais, foram utilizadas para melhor entender a composição das comunidades de arquéias em três manguezais do Estado de São Paulo. Adicionalmente, um gene relacionado a oxidação da amônia foi alvo de estudo, com a finalidade de inferir sobre a possibilidade das arquéias promoverem tal transformação nos sedimentos dos manguezais analisados. Os resultados mostram que diferentes manguezais hospedam comunidades filogeneticamente e funcionalmente distintas de arquéias, e indicam uma forte pressão de seleção sobre tais comunidades, exigindo um grande potencial adaptativo e adequação das espécies presentes para a colonização deste ecossistema sob diferentes condições de contaminação.

3.2 DESENVOLVIMENTO

3.2.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1.1 Manguezais e amostras avaliadas

No presente trabalho foram avaliadas as comunidades microbianas presentes em três manguezais localizados no Estado de São Paulo, sendo dois no município de Bertioga e um no município de Cananéia (Tabela 3.1). Estes manguezais apresentam características diferentes; sendo que em Bertioga, um manguezal tem como fator externo apenas um baixo efeito antrópico, enquanto que o outro sofreu o impacto causado por derramamento de petróleo (aproximadamente 35 milhões de litros no ano de 1983). O manguezal localizado na cidade de Cananéia (Ilha do Cardoso) foi considerado como ambiente pristino e controle externo para as análises, o qual esta situado em uma área de reserva ambiental. Ocorre também nos manguezais amostrados, diferenças entre a sistemática de inundação destes ambientes. Enquanto que nos dois manguezais localizados em Bertioga, a água de inundação é composta por uma mistura entre água do mar e do Rio Iriri, no manguezal de Cananéia a inundação ocorre pelo recebimento de água diretamente do mar.

Tabela 3.1 - Localização geográfica dos manguezais amostrados no Estado de São Paulo

	Bertioga Contaminado	*Bertioga*	*Cananéia*
Latitude	23° 53’ 74’ S	23° 54’ 08’ S	25° 05’ 03’ S
Longitude	46° 12’ 50’ W	46° 15’ 06’ W	47° 57’ 75’ W

As amostras avaliadas são oriundas do sedimento destes manguezais, amostrados ao longo de um transecto em cada uma das áreas consideradas. Os transectos foram determinados com orientação do mar para o continente, delimitando três sub-regiões, as quais são facilmente diferenciadas; uma primeira região próxima ao mar ou rio, uma segunda região no centro do manguezal, e uma terceira em uma área próxima ao continente, chamada de restinga (Figura 3.1). A composição do grupo de amostras foi realizada com três repetições de cada ponto

em cada manguezal, totalizando um total de 27 amostras (3 manguezais x 3 localidades x 3 repetições). Cada amostra constituiu-se de uma quantidade de sedimento, obtida por amostrador de 30 cm, com 7 cm de diâmetro, que foi introduzido no sedimento dos manguezais e retirado contendo o material a ser analisado.

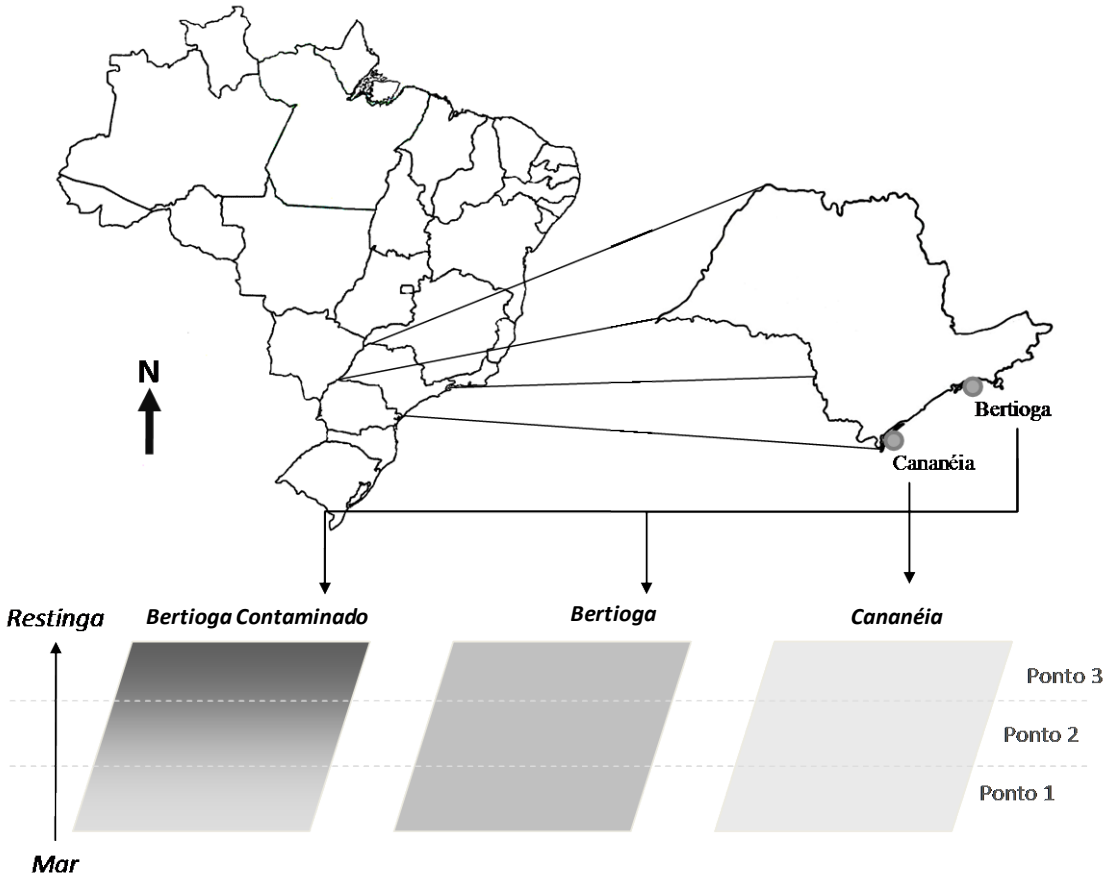


Figura 3.1 - Esquema dos pontos de amostragem em cada manguezal avaliado, evidenciado a cobertura da diversidade nos pontos próximos ao mar ou rio (ponto 1), no centro do manguezal (Ponto 2) e também na área próxima ao continente (Ponto 3)

Em relação às diferenças entre os manguezais amostrados, os pontos 2 e 3 do manguezal de Bertioga com contaminação são aqueles com maior impacto do derramamento do óleo. O ponto 1, por estar separado dos demais fisicamente por um pequeno córrego que corta tal manguezal, tem menor efeito da contaminação, e assemelha-se morfologicamente aos pontos de análise do manguezal de Bertioga sem contaminação. Análises físico-químicas das amostras de todos os pontos foram realizadas com a finalidade de determinar as diferenças encontradas nos locais de

cada coleta. Estas análises foram realizadas Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP, Piracicaba), de acordo com a metodologia descrita por Van Raij et al. (2001) (Tabela 3.2).

Tendo em vista a vegetação, o manguezal de Bertioga com derramamento de óleo (ponto 1) é dominado pela espécie *Rhizophora mangle*, e nos pontos 2 e 3 onde ocorreu um maior impacto pelo derramamento a espécie *Laguncularia racemosa* mostra-se ser mais resistente ao impacto causado pelo petróleo. No manguezal de Bertioga sem derramamento as espécies comumente encontradas nos manguezais brasileiros (*R. mangle*, *L. racemosa* e *Aviccenia* sp.). No manguezal preservado da Ilha do Cardoso-Cananéia as espécies típicas de manguezais se encontram distribuídas de forma uniforme em todo o transecto, mostrando que o ambiente se mantém preservado, e com sua estrutura vegetal natural.

Tabela 3.2 - Análises físico-químicas dos pontos avaliados dentro dos três manguezais amostrados

Análise	Bertioga Contaminado			Bertioga			Cananéia		
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
Composição Física									
areia:silte:argila (%)	34:60:6	69:26:5	35:50:15	71:24:5	59:36:5	57:38:5	22:26:52	82:06:12	78:12:10
Umidade	65,16	69,66	48,26	73,97	78,39	75,82	69,9	40,79	49,18
condutividade (mS)	8,98	12,32	10,68	9,42	12,85	9,82	14,72	9,8	6,7
Dados Químicos									
pH	6,9	6,8	6,4	7,1	6,8	6,9	5,9	6,4	6,3
matéria orgânica (%)	10,86	12,89	10,89	10,28	9,89	11,43	7,54	5,43	6,35
nitrogênio (N) (%)	0,13	0,45	0,31	0,29	0,26	0,34	0,72	0,21	0,23
fósforo (P) (%)	0,13	0,11	0,19	0,07	0,07	0,12	0,07	0,11	0,09
potássio (K) (%)	0,09	0,08	0,20	0,08	0,07	0,08	0,14	0,08	0,04
cálcio (Ca) (%)	0,27	0,31	0,33	0,24	0,19	0,23	0,15	0,22	0,19
magnésio (Mg) (%)	0,20	0,23	0,34	0,19	0,17	0,19	0,19	0,10	0,07
enxofre (S) (%)	0,31	0,36	0,32	0,24	0,26	0,20	0,23	0,14	0,14
sódio (Na) (mg/kg)	5.327	8.092	9.503	4.770	4.400	4.947	7.350	2.244	1.336

3.2.1.2 Extração de DNA das amostras de sedimento

A partir de cada uma das amostras, o DNA total foi extraído de acordo com metodologia descrita para o *Power Soil DNA Isolation kit* (MoBio, EUA). Após a extração, a integridade e a qualidade dos DNAs obtidos foram verificadas em eletroforese em gel de agarose 1% (w/v), seguida coloração em brometo de etídeo e visualização em luz ultravioleta. Para quantificação dos genes de interesse por PCR em tempo real, os DNAs extraídos foram adicionalmente quantificados por meio da análise em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, EUA).

3.2.1.3 Análise dos genes de interesse por qPCR

As análises de qPCR foram realizadas para quantificação dos genes de interesse (o gene *amo*A de arquéias e o gene 16S rDNA de arquéias). As reações foram realizadas em equipamento iQ5 (BioRad), utilizando os sistema *SYBR GreenI*. Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas em volume final de 25 µl contendo 12.5 µl do kit Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Brasil), e os primers na concentração de 0,2µM.

As amplificações foram realizadas com um ciclo de desnaturação inicial a 95ºC por 3 min seguidos de 35 ciclos de amplificação, utilizando os *primers* e parâmetros descritos na literatura. Para o gene *amo*A de arquéias, os *primers* amo196F e amo277R foram usados numa amplificação com uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos (TREUSCH et al., 2005). Para arquéias totais a quantificação foi realizada com os *primers* 787F combinado com o *primer* 958R numa reação com ciclos de 95°C por 30 segundos, seguidos de 60°C por 1 minuto (ØVREAS et al., 1997). Em todas as reações, uma curva de desnaturação foi realizada no final, com temperatura aumentando de 60º à 96ºC para verificar a especificidade da amplificação.

Para quantificação absoluta dos genes alvos nas amostras, curvas padrões foram obtidas, realizando amplificações com o número de cópias conhecidas do DNA molde, adicionadas nas reações em diluições seriadas. Desta maneira, os

dados da amplificação do DNA extraído de amostras ambientais (Ct) foram interpolados para determinar o número de cópias do gene de interesse na amostra avaliada. A amplificação das diferentes diluições do DNA alvo também resultou na geração de dados de eficiência de amplificação e de correlação logarítmica (R^2) entre o número de ciclos e a quantidade de DNA nas amostras (Figura 3.2).

3.2.1.4 Análise das comunidades de arquéias do sedimento de manguezais por meio de DGGE

Os DNAs totais extraídos das amostras ambientais foram submetidos à amplificação com *primers* específicos e descritos na literatura para os genes de interesse. As análises foram realizadas com *primers* e condições previamente descritas na literatura; para estudar as comunidades de arquéias totais (ØVREAS et al., 1997) com os primers Arch21F (5′-TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA-3') e Arch958R (5′-YCC GGC GTT GAM TCC AAT T-3′) usados na primeira reação de PCR e no segundo PCR (*nested*) foram utilizados os *primers* Arch340FGC (5′-GC grampo-CTA CGG GGY GCA SCA G-3') e Arch519R (5′-TTA CCG CGG CKG CTG-3′) (MOYER et al., 1998). Os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados foram de 937 pb e 179 pb, respectivamente. Ambas as reações de amplificação foram realizadas em 50 µL de solução contendo 1,8 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer*, 0,01 µL de BSA (10 $mg.ml^{-1}$) em solução tampão para DNA polimerase *Taq* contendo 1 U DNA polimerase Taq (Fermentas, São Paulo, Brasil) e 1 µL de DNA molde (5 a 10 ng), sendo o restante do volume completado com água deionizada esterilizada. O DNA ambiental foi utilizado como molde na primeira amplificação, enquanto que 1 µL do produto amplificado na primeira PCR foi utilizado como molde para a segunda reação. As condições de amplificação foram compostas de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguida por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C para desnaturação, 30 segundos a 53°C para o anelamento dos *primers* 1 minuto a 72°C para a extensão dos fragmentos; uma extensão final de 6 minutos a 72°C foi acrescida ao término dos ciclos. Os *amplicons* resultantes da segunda amplificação foram separados e quantificados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1×.

O DNA oriundo das arquéias amônio oxidantes (*amo*A) foram amplificados usando os *primers* amoA-23F (5′-ATG GTC TGG CTWAGA CG-3′) e amoA-616R (5′-GCC ATC CAT CTG TAT GTC CA-3′) (SAHAN; MUYZER, 2008), sendo que na segunda reação da *nested* PCR o *primer forward* foi acrescido de grampo GC. A amplificação do gene ocorreu em 50 µL de solução contendo: 5 µL de 10x Tampão *Taq* (750 mM Tris-HCL pH 8,8, 200 mM de $(NH_4)_2SO_4$ e 0,1% de Tween); 2,0 µL de 50 mM $MgCl_2$, 0,2 µL de '*bovine serum albumin*' (BSA) em 0,4 µg/µL, 0,5 µL de 25 mM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), 0,2 µL de 5 U μL^{-1} de *Taq* DNA Polimerase recombinante (Bioline Life Sciences), 1 µL de cada iniciador (10 pmoles μL^{-1}) e 10 ng de DNA. O restante do volume foi completado com água deionizada esterilizada. As condições de amplificação foram: 5 minutos a 95°C; 10 ciclos de 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 55°C; 1 minuto a 72°C; 25 ciclos de 30 segundos a 92°C; 30 segundos a 55°C; 1 minuto a 72°C; e 10 minutos de 72°C de extensão final. As amplificações foram previamente verificadas em gel de agarose 1% antes de serem submetidas à análise de DGGE.

As análises de DGGE foram realizadas no aparelho *Ingeny PhorU2 system* (Ingeny, Goes, Holanda), com gradiente desnaturante variando de acordo com o gene estudado. As soluções estoque utilizadas foram 0 e 80% desnaturantes, onde 100% de desnaturação consiste na concentração de 7 M de uréia e 40% de formamida. Dependendo da análise a ser realizada, a concentração de poliacrilamida (Acrilamida:Bis 37,5:1) foi variável, entre 6,0 e 8,0%. Para a análise do gene *amo*A de arquéias, o gel de DGGE foi preparado com soluções de poliacrilamida 6,0%, e o gradiente utilizado foi de 15 a 55%. Na análise do perfil de arquéias, o gradiente variou entre 30-55% e o gel foi feito com concentração de 8,0% de poliacrilamida. Após a eletroforese, todos os géis foram corados com SYBR Green I e/ou nitrato de prata e foto-documentados em luz ultravioleta.

3.2.1.5 Determinação das variáveis ambientais significativas na diversidade microbiana

Os perfis de bandas dos géis de DGGE foram correlacionados com os dados ambientais dos manguezais por meio de análise multivariada, realizada no *software* Canoco (Canoco 4.5, Biometris, Wageningen, Holanda). As bandas observadas nos géis de DGGE foram consideradas como espécies e suas intensidades relativas

consideradas como frequência destas espécies. Como fatores ambientais foram consideradas as variáveis: manguezais amostrados e pontos amostrados dentro dos manguezais.

Com este conjunto de dados, foi primeiramente realisada a análise de correlação (DCA) entre as amostras e variáveis, que forneceu informação sobre a distribuição dos dados de espécies em cada grupo microbiano avaliado. Em casos onde a distribuição foi linear (valor do primeiro eixo < 4,00), a análise multivariada foi realizada por análise de redundância (RDA), enquanto que valores >4,00 (distribuição normal) indicaram a melhor análise por correspondência canônica (CCA) (ANDREOTE et al., 2009). Em cada análise, o teste estatístico de permutação de Monte Carlo foi aplicado considerando 499 permutações aleatórias, permitindo avaliar a significância (valor *p*), dos fatores ambientais na distribuição de espécies nas amostras. Nestas análises foram também obtidos os valores de lambda-1, que mostram as porcentagens das variâncias explicadas pelos fatores ambientais independentemente.

3.2.1.6 Construção e análise de biblioteca de clones dos genes de interesse

Nesta primeira etapa da análise filogenética de arquéias foram construídas duas bibliotecas, uma para cada gene (16S DNAr e *amo*A), com o intuito de iniciar a descrição dos grupos presentes nos sedimentos dos manguezais avaliados. Para isto, os DNAs obtidos de cada uma das extrações das amostras ambientais foram submetidos à amplificação com *primers* específicos para o gene de interesse, seguido de metodologia previamente descrita para o gene 16S DNAr de arquéias (ØVREAS et al., 1997). Para o gene *amo*A o *primer* usado foi o arch-amoAF (5′-STA ATG GTC TGG CTT AGA CG-3′) e arc-amoAR (5′-GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT-3′; 635 pb) (FRANCIS et al., 2005). Posteriormente, os produtos de amplificação foram purificados e clonados em plasmídeos de *Escherichia coli* utilizando o kit *pGEM-T Easy Vector System* (Promega, Madison, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As colônias que apresentaram insertos no vetor (coloração branca) foram selecionadas para detecção do inserto, por meio de amplificação com os *primers* M13F e M13R. Os clones com insertos de tamanho esperado foram submetidos ao

sequenciamento. Com esta metodologia foram obtidos 84 clones do gene 16S DNAr de arquéias e 62 clones do gene *amo*A de arquéias. Tais sequências foram analisadas quanto a sua qualidade e as sequências de vetores foram removidas pelo programa Lucy, presente no *pipeline* do *Ribosomal Data Project*.

As análises das sequências foram realizadas por filogenia, e também por meio de aplicação de técnicas descritas na literatura para a análise de bibliotecas de clones, como a determinação de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) e rarefação, utilizando o programa MOTHUR que gera também índices ecológicos de riqueza e diversidade de espécies (SCHLOSS et al., 2009).

3.2.1.7 Análise da comunidade de arquéias por meio do sequenciamento parcial do gene 16S DNAr via pirosequenciamento

O sequenciamento das amostras por pirosequenciamento foi feito através de terceirização do serviço (Helixxa, Campinas, São Paulo, Brasil). Nesta análise foram avaliadas duas repetições de quatro áreas distintas; BrMgv01 (ponto 1 do manguezal contaminado Oil Mang), BrMgv02 (pontos 2 e 3 do manguezal contaminado Oil Mang), BrMgv03 (todos os pontos do manguezal Ant Mang), e BrMgv04 (todos os pontos do manguezal de Cananéia Prs Mang) (Figura 3.2). Estas quatro áreas foram determinadas com base em uma série de análises realizadas por nosso grupo de trabalho, como perfis de DGGE de bactérias, arqueías e fungos, alem de quantificações de genes de interesse envolvidos na ciclagem de nitrogênio e enxofre. Tais estudos são conduzidos por outros estudantes de nosso grupo, e esta divisão é usada para análises mais refinadas como pirosequenciamento de produtos de PCR ou de DNA ambiental.

Dessa forma, os DNAs extraídos foram amplificados com os *primers* ArcR (5'-TTA CCG CGG CKG CTG-3') e ArcF (5'- CCC CTA CGC CCY GCA SCA G-3'), flanqueando assim a região V3 (bases 340 a 519 do gene 16S DNAr). Em tais *primers* foram adicionados adaptadores A e B, conforme o manual do fabricante do equipamento (Roche, EUA). Adicionalmente, o *primer foward* usado para cada amostra recebeu uma tag de identificação composta de 6 a 8 bases, que serviu para identificar a origem de cada uma das sequências obtidas. A análise inicial das

sequências foi feita usando o *Pyrosequencing Pipeline do Ribosomal Database Project* (RDP), onde foi feita inicialmente uma triagem inicial que as separou com base em suas tags de identificação de acordo com sua origem (cada local amostrado). Neste processo as sequências de baixa qualidade foram removidas. Após isso, os grupos de sequências foram alinhadas e agrupadas em *datasets*, que foram submetidos à afiliação taxonômica usando o RDP Classifier. Com estes dados foram construídos gráficos de abundância relativa de grupos de arquéias presentes no sedimento de manguezal das diferentes áreas estudadas.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Quantificação das comunidades alvo por PCR em tempo real

A aplicação da metodologia de PCR em tempo real permitiu quantificar as comunidades-alvo nas amostras de sedimentos dos distintos manguezais analisados. Este sistema foi utilizado para quantificar o número de cópias do gene 16S DNAr de arquéias e do gene *amo*A de arquéias (AOA). A obtenção de curvas padrão foi possível com o uso de moldes de amplificação em diluições seriadas de uma concentração conhecida do DNA alvo de amplificação (Figura 3.2). Tal metodologia também permitiu a obtenção de valores de eficiência da amplificação dos genes alvo, que foram de 1,64 em arquéias e 0,97 em *amo*A. Os valores de regressão logarítmica das curvas obtidas (R^2) foram também obtidos, sendo 0,99 para as duas quantificações. Adicionalmente, a especificidade de amplificação foi avaliada por meio da análise de uma curva de desnaturação ao final da amplificação das amostras. Nesta curva de desnaturação, a presença de picos únicos evidenciou a amplificação de um produto único (Figura 3.2). A confirmação da amplificação do fragmento alvo foi feita por análise dos tamanhos dos fragmentos amplificados em eletroforese em gel de agarose 1.5%, onde fragmentos de tamanho esperados foram observados, com 171 pb 16S DNAr e 81 pb no gene *amo*A de arquéias. Com a validação do sistema de detecção as amostras foram analisadas e as comunidades alvo foram quantificadas.

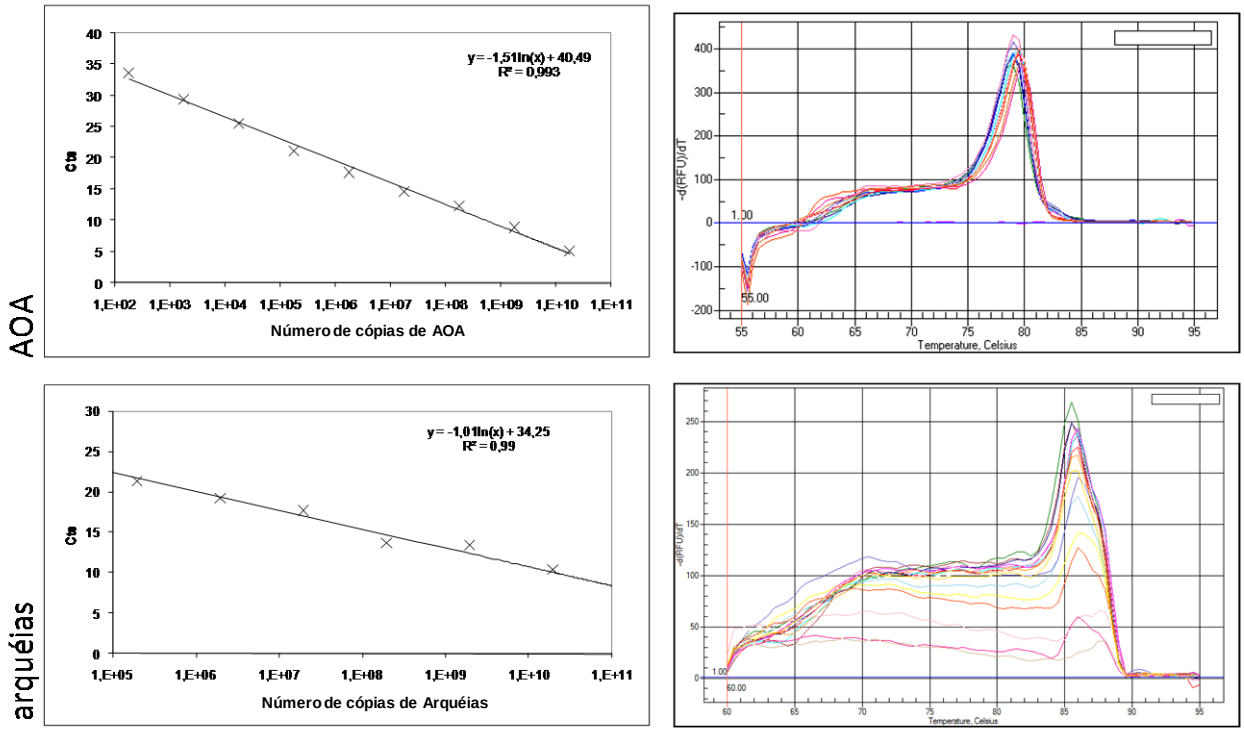


Figura 3.2 - Construção das curvas de diluição e análise de amplificação específica por meio de curva de dissociação (*melting*) dos genes quantificados nas amostras de sedimentos dos manguezais avaliados. As equações mostram a correlação logarítmica entre a quantidade de DNA alvo e os valores de Cts, e os valores de R_2 evidenciam a fidelidade na quantificação de diferentes quantidades de DNA, seguindo os padrões utilizados

Considerando a quantificação de arquéias nas amostras de manguezais, esta comunidade mostrou ter abundância similar nos diferentes manguezais e pontos amostrados. Assim sendo a densidade de arquéias nos manguezais analisados, representada pelo número de cópias do gene 16S DNAr por grama de sedimento, que variou em valores de log de 8,90 e 9,78 (Figura 3.3).

Para o gene *amo*A de arquéias, a quantificação foi bastante restrita, sendo que apenas os pontos localizados no manguezal de Bertioga sem contaminação e o ponto com menor impacto do derramamento de óleo do manguezal de Bertioga contaminado apresentaram amplificações. O único ponto localizado no manguezal contaminado apresentou uma menor densidade de AOA, com valor log médio de 3,57. Já os pontos localizados no manguezal sem contaminação mostraram uma densidade de *amo*A constante nos três pontos amostrados, com valores log variando entre 4,66 e 4,78 (Figura 3.3).

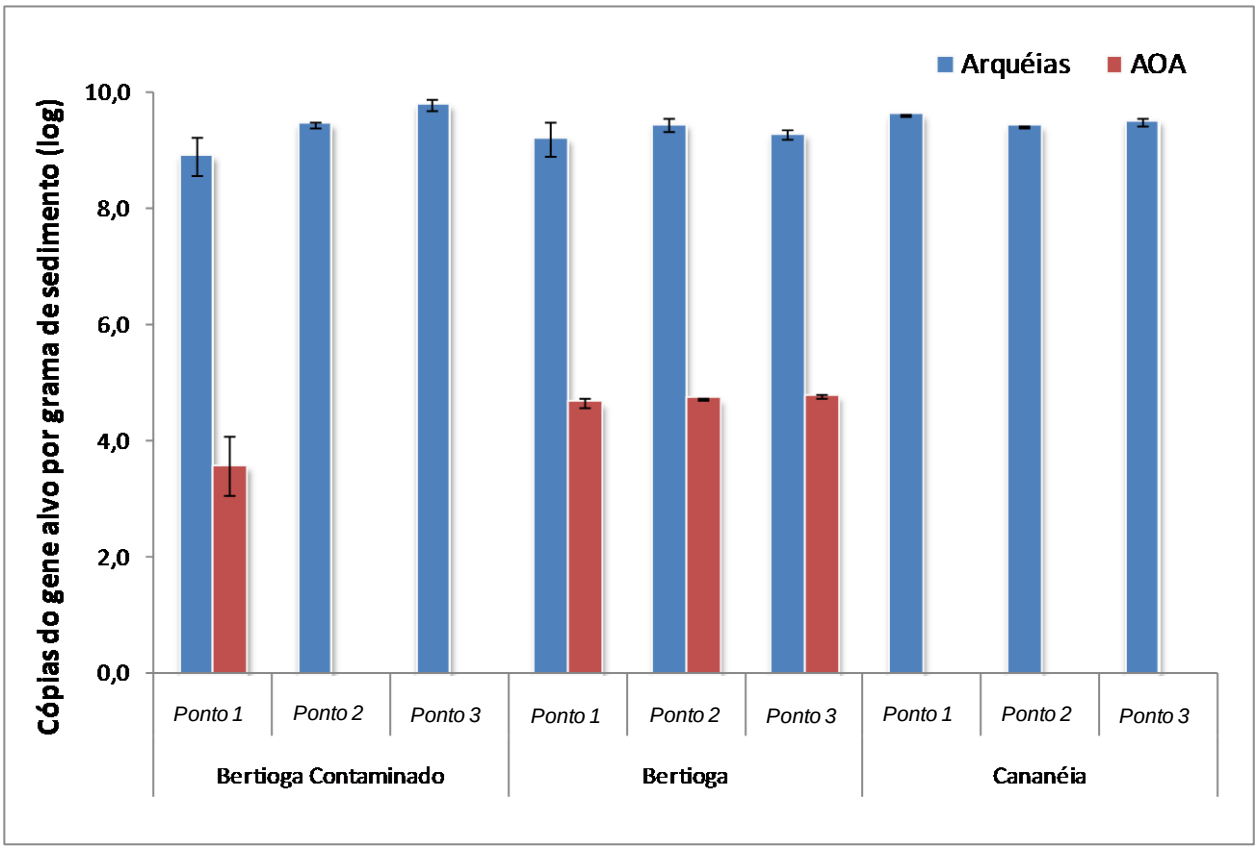


Figura 3.3 - Quantificação dos genes 16S DNAr de arquéias e *amo*A de arquéias (AOA) por meio de qPCR, nas diferentes amostras de sedimento analisadas. Os valores indicam a média das três repetições utilizadas, sendo que para cada uma delas, duas reações foram realizadas para evitar variações intrínsecas ao equipamento. As barras indicam o erro padrão da média nas diferentes amostras quantificadas

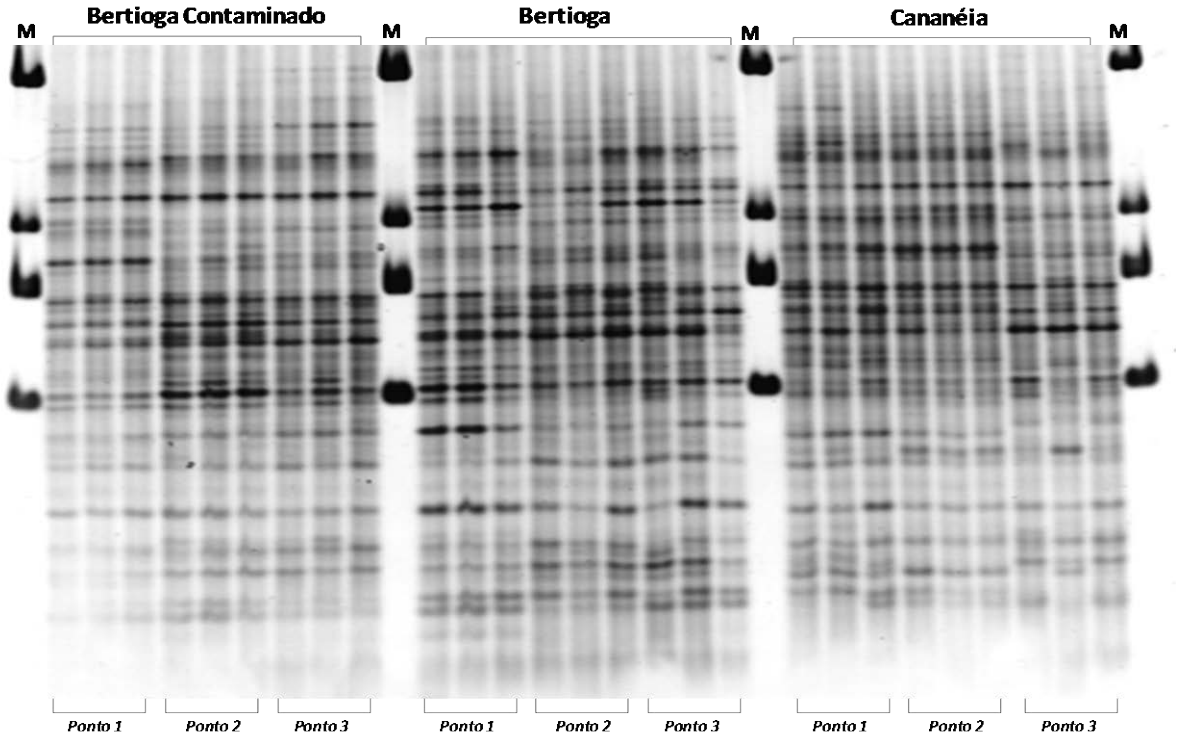
3.3.2 Análise dos perfis das comunidades de arquéias por DGGE

A análise de DGGE permitiu observar a estrutura das comunidades de arquéias dentro de aspectos filogenéticos e funcionais nos manguezais avaliados. O perfil de DGGE para arquéias totais mostrou elevada riqueza de bandas em todas as amostras avaliadas. Estes perfis foram similares qualitativamente, porém variaram na intensidade das bandas em amostras distintas (Figura 3.4a). Assim, apesar de os mesmos grupos de arquéias estarem presentes nas amostras avaliadas, a densidade das populações componentes pode variar dentro da comunidade amostrada em cada ponto de estudo. Isto ficou evidenciado pela análise de PCA, onde ocorreu a separação inicial de amostras dos pontos 1 e 2 do manguezal de

Cananéia. Analisando os dados físico-químicos das amostras (Tabela 3.2), pode-se sugerir que tal diferença esteja associada às alterações na salinidade destes pontos, que estão localizados mais próximos ao mar. A separação secundária em tal análise foi feita em relação aos manguezais amostrados, principalmente separando os dois manguezais de Bertioga (Figura 3.4b), o que indica o papel da contaminação por petróleo sobre a composição de tal comunidade.

Em relação ao perfil de DGGE para o gene *amo*A, todas as amostras resultaram em perfis similares, limitando as inferências sobre alterações sobre esta comunidade nos manguezais e pontos estudados (Figura 3.5a). Ainda, vale lembrar que tal gene não foi detectado na maioria das amostras, por qPCR. No entanto, foi possível obter amplificação, ainda que pouco eficiente, de tal gene em todos os pontos após a realização de dois PCRs, sendo o primeiro sem o grampo de GC, e o segundo utilizando um *primer* com este grampo, e utilizando o produto da primeira amplificação como molde.

(a)



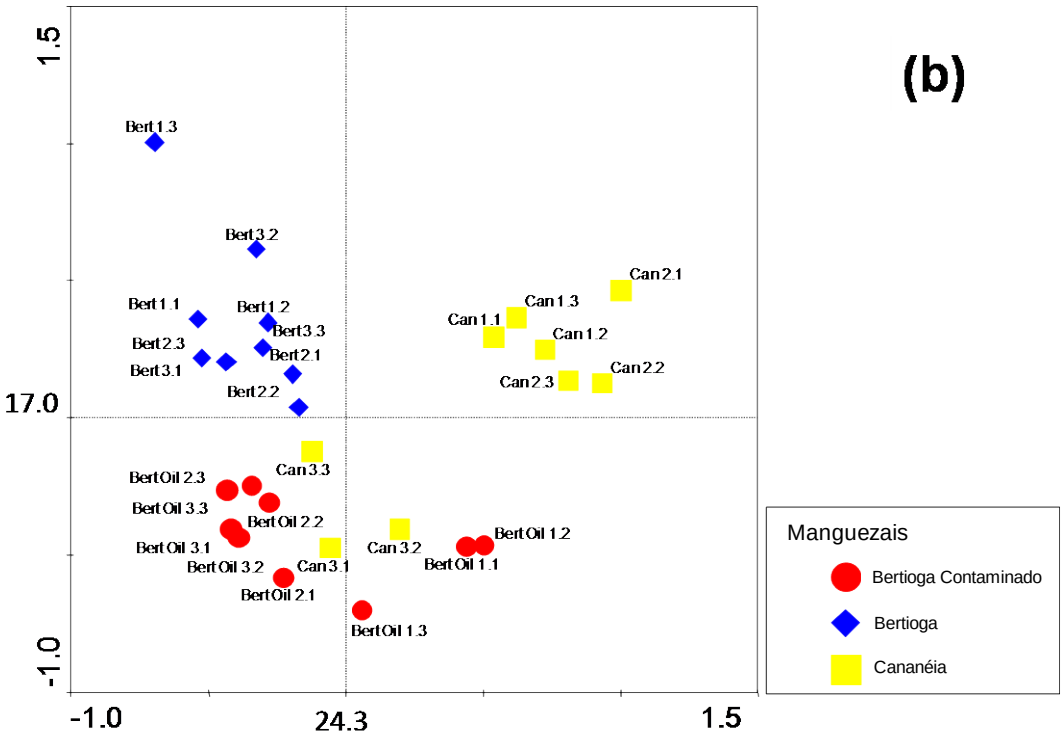


Figura 3.4 - Perfil de DGGE para o domínio Archaea (a), baseado no gene 16S DNAr e para o nas diferentes amostras de sedimentos avaliadas. M indica as linhas com marcador. Análise de componentes principais (PCA) dos perfis de DGGE do domínio Archaea (b). Após o nome das amostras, os valores indicam os pontos de coleta e as repetições realizadas em cada ponto. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância total dos dados representada pelo eixo

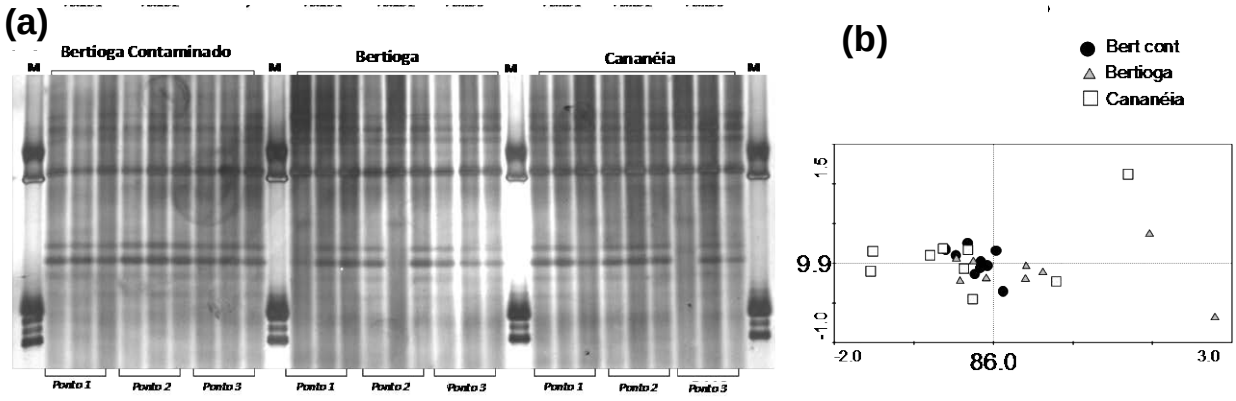


Figura 3.5 - Perfil de DGGE (a) e análise de componentes principais (PCA) (b) para o gene amoA de arquéias nas distintas amostras analisadas. M indicam as linhas com marcador. Após o nome das amostras, os valores indicam os pontos de coleta e as repetições realizadas em cada ponto. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância total dos dados representada pelo eixo

3.3.3 Análise dos fatores ambientais na composição das comunidades acessadas

A correlação entre variáveis ambientais e a composição dos grupos microbianos alvo foi realizada por meio de análise multivariada. Os valores de Lambda1 e de *p* obtidos para cada comunidade estão apresentados na Tabela 3.3. Dessa forma, a análise multivariada realizada foi a RDA, permitindo inferir sobre as variações inter e intra-manguezais observadas para cada comunidade microbiana. Muitos dos resultados aqui obtidos confirmam as observações feitas visualmente e discutidas no item anterior. No entanto, novos efeitos puderam ser observados e embasados estatisticamente por meio de tal análise.

Tabela 3.3 - Quantificação da influência das variáveis ambientais sobre a composição das comunidades de arquéias analisadas. Os valores indicam a porcentagem da variância total causada independentemente por cada fator. Variáveis significativas estatisticamente (p<0,05), de acordo com o teste de permutação de Monte Carlo, estão em negrito e indicadas com *

	16S rRNA		AOA (*amo*A)	
	Lambda 1	Valor de *p*	Lambda 1	Valor de *p*
Bertioga Cont.	**0.12**	**0.002***	0.02	0.706
Bertioga	**0.15**	**0.002***	**0.16**	**0.014***
Cananéia	**0.16**	**0.002***	0.06	0.698
Ponto 1	**0.05**	**0.018***	0.01	0.876
Ponto 2	0.03	0.218	0.01	0.18
Ponto 3	0.06	0.102	0.02	0.432
Condutividade	**0.12**	**0.002***	0.03	0.194
Salinidade	**0.11**	**0.002***	0.02	0.768

Inicialmente, foi possível observar alterações maiores quando comparados manguezais distintos, sendo dessa maneira, as diferenças intra-manguezais menos significativas. Este fato fica mais evidente quando observados os valores de Lambda1, representados na Tabela 3.3. Tais valores quantificam a variância

correspondente a cada variável ambiental considerada. Assim sendo, os valores maiores se referem aos diferentes manguezais analisados, onde os menores valores são referentes às alterações intra-manguezais. Ainda, vale ressaltar que quando alterações dentro de um mesmo manguezal foram observadas, estas foram relacionadas com alterações nos perfis de DGGE nas áreas próximas ao mar (Ponto 1 de Cananéia) ou na área de maior contaminação do manguezal de Bertioga contaminado (Pontos 2 e 3).

3.3.4 Determinação da filogenia de arquéias nos manguezais avaliados por sequenciamento de clones

A filogenia dos grupos taxonômicos que compõem as comunidades microbianas avaliadas foram inicialmente determinadas por meio da análise de sequências de bibliotecas de clones, utilizando diferentes conjuntos de *primers*, para os genes 16S DNAr de arquéias e do gene *amo*A de arquéias.

Nesta primeira análise, devido às pequenas diferenças qualitativas observadas nos perfis de DGGE, apenas uma biblioteca foi construída, combinando os produtos de PCR de todas as amostras, sendo analisados a partir desta biblioteca, 84 sequências do gene 16S DNAr e 62 sequências do gene *amo*A.

A dominância dentro do domínio *Archaea* foi verificada para os filos Thaumarchaeota (45 sequências) e Euryarchaeota (25 sequências), além da presença de sequências afiliadas como *Unclassified Archaea* (14 sequências). Dentro destes grupos, a maior parte das sequências foi afiliada a *uncultured archeon clone* (Figura 3.6). Os gêneros de arquéias que mostraram maiores similaridades com as sequências obtidas foram *Aeropyrum*, *Ignicoccus*, *Ignisphaera*, *Staphylothermus*, *Thermodiscus* e *Thermofilum* para o filo das Crenarchaeota; e *Archaeoglobus*, *Geoglobus*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanoculleus*, *Methanolobus*, *Methanothermobacter*, *Methanothrix* e *Thermococcus* para Euryarchaeota (Figura 3.6).

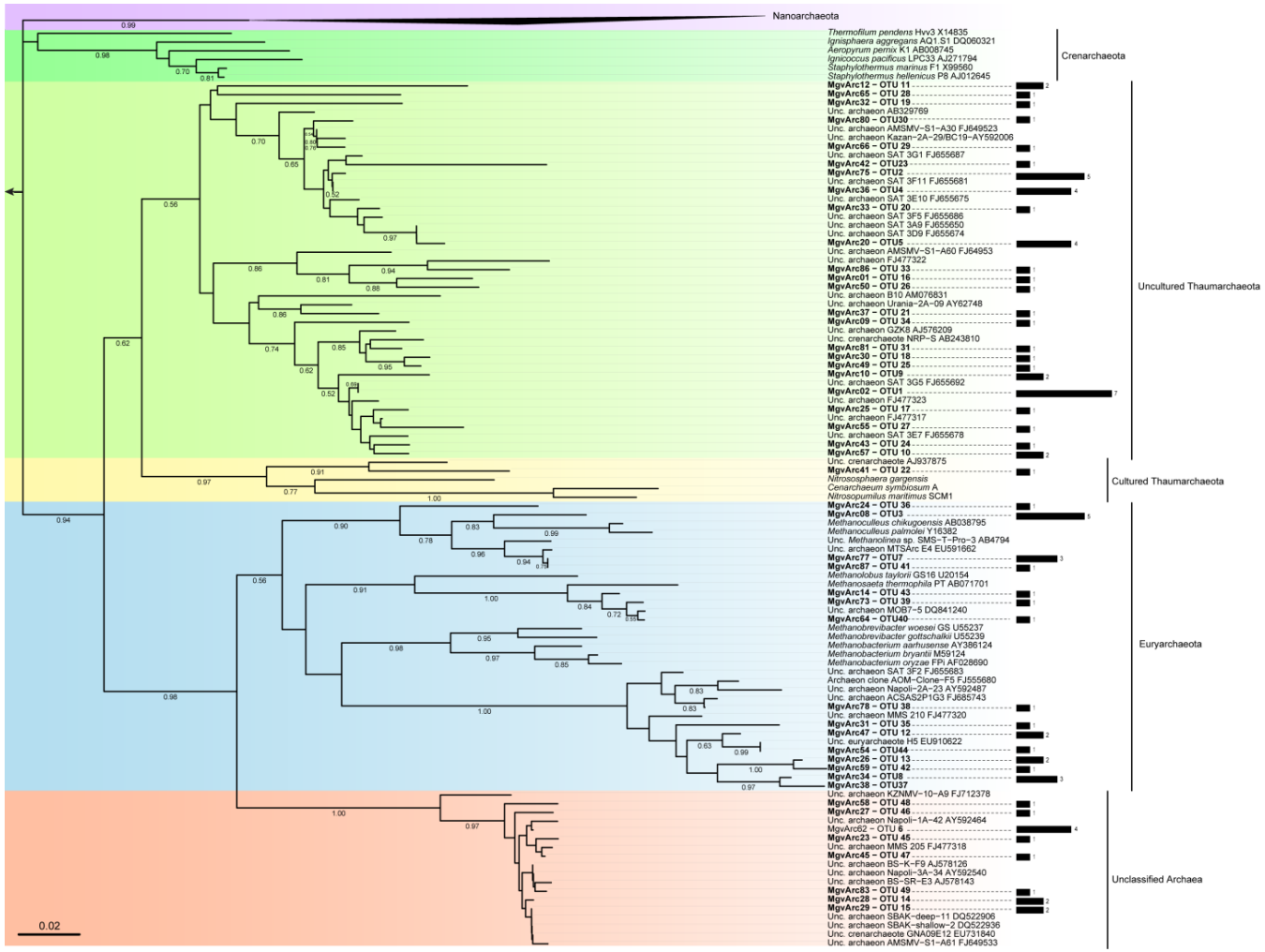


Figura 3.6 - Análise filogenética das sequências pertencentes ao domínio Archaea. A filogenia foi determinada pelo método Neighbor joining, utilizando o parâmetro de Kimura-2, e as dissimilaridades encontradas são representadas pelas distâncias nos ramos. O alinhamento final das sequências utilizadas para a análise foi de 622 pares de base. Os valores de *bootstrap* (1000x) maiores do que 50 são indicados nos ramos. O grupo externo é composto por sequências de arquéias de outro filo, *Nanoarchaeum*

Considerando a filogenia das sequências do gene *amo*A, pode-se observar que os manguezais apresentam representantes deste gene afiliados aos diferente grupos descritos para sua classificação. Por se tratar de uma interface entre o mar e o continente, foram encontradas nas amostras de manguezal sequências similares àquelas obtidas de ambiente marinho, como também sequências com similaridade às encontradas em solos e sedimentos (Figura 3.7). O grupo das sequências afiliadas ao ambiente solo/sedimento foi mais diverso, com a formação de seis subgrupos, enquanto que o grupo de ambiente marinho foi dividido em dois subgrupos. Além destes, uma sequência mostrou-se similar ao grupo externo, representado por amostras obtidas de profundezas oceânicas (Figura 3.7).

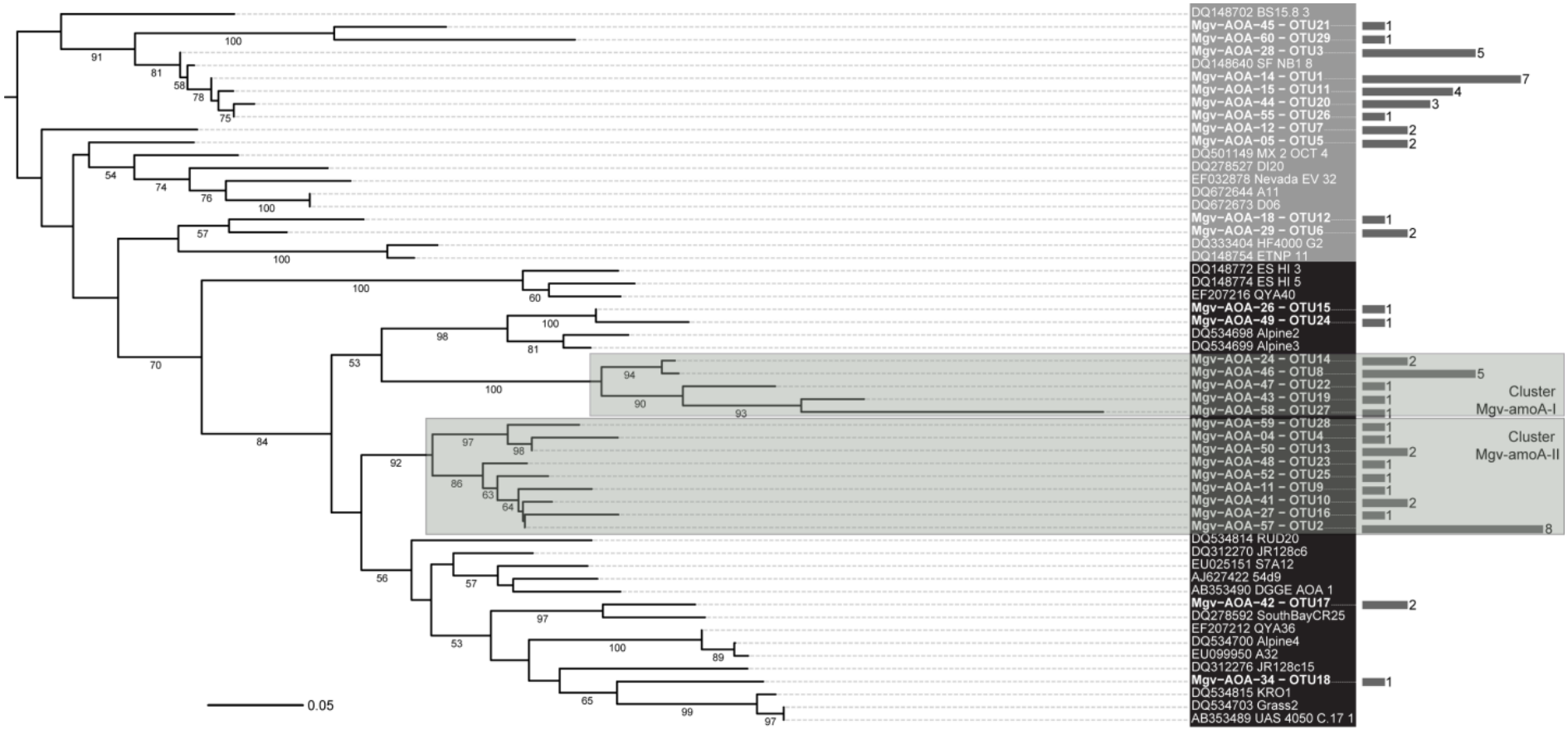


Figura 3.7 - Análise filogenética das sequências do gene *amo*A de arquéias. A filogenia foi determinada pelo método Neighbor joining, utilizando o parâmetro de Kimura-2. As dissimilaridades encontradas são representadas pelas distâncias nos ramos. A sequência de DNA utilizada para a análise foi de 503 pares de base. Os valores de *bootstrap* (1000x) maiores do que 50 são indicados nos ramos

3.3.5 Dados ecológicos obtidos das bibliotecas de clones analisadas

Além da afiliação taxonômica das sequências, tal análise permitiu obter índices ecológicos destes grupos (Shannon, Simpson, ACE e ChaoI) (Tabela 3.4), além da análise de rarefação (Figura 3.8). Os dados mostram que a diversidade e a riqueza de espécies de arquéias em manguezais são limitadas, provavelmente devido às condições ambientais (anaerobiose e salinidade) intrínsecas a este ambiente, o que pode levar a uma menor diversidade microbiana. Os valores de diversidade evidenciam tal observação com maiores valores para a comunidade de arquéias, e valores menores para arquéias amônio oxidantes (gene *amo*A). Analisando os valores de riqueza, pode-se também inferir sobre os números de grupos microbianos que constituem as comunidades avaliadas. Os maiores valores de estimativa de riqueza foram obtidos para a comunidade de arquéias, porém tanto estes valores como aqueles na análise para o gene *amo*A foram relativamente baixos, evidenciando a forte pressão de seleção que ocorre neste ecossistema.

Tabela 3.4 - Dados ecológicos das comunidades microbianas acessadas em manguezais do Estado de São Paulo, determinadas por agrupamento com *cut-off* de 0.03

Comunidades acessadas		Números de Sequências/UTOs	Índices Ecológicos		
			Shannon	ChaoI	ACE
Arquéia Total		81 / 47	3.74 (± 0.19)	141 (89-267)	148 (96-262)
	Thaumarchaeota	43 / 24	3.13 (± 0.25)	66 (40-146)	73 (44-154)
	Euryarchaeota	24 / 14	2.52 (± 0.33)	30 (18-79)	33 (19-85)
	Não classificados	13 / 8	2.13 (± 0.41)	17 (11-46)	24 (13-78)
AOA		62 / 29	3.08 (± 0.23)	44 (33-78)	55 (39-101)

Considerando as análises de rarefação para os grupos acessados, temos que as curvas tendem a estabilizar, mostrando que, com base nesta metodologia, após um determinado ponto, não há um incremento significativo no número de novos grupos descritos com o aumento do número de clones sequenciados. Esta observação é mais evidente para a análise do gene *amo*A (Figura 3.8). Para arquéias, a análise de um maior número de sequências poderia levar a melhor descrição da diversidade presente nos manguezais estudados (Figura 3.9), o que foi feito posteriormente na análise de pirosequenciamento.

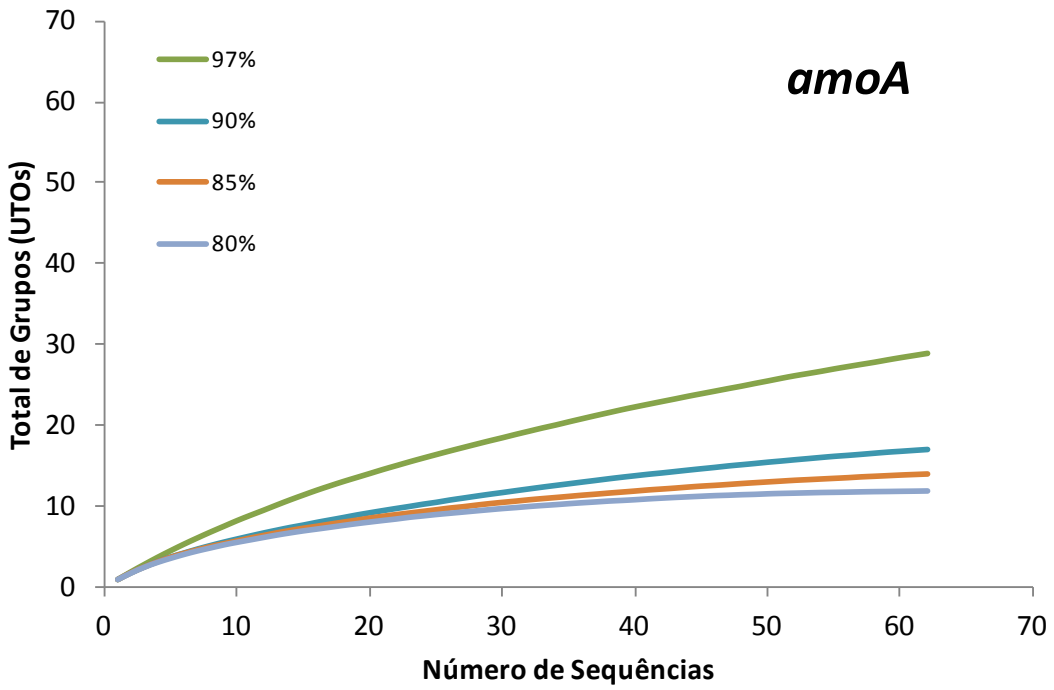


Figura 3.8 - Análise de rarefação das sequências obtidas do gene *amo*A, considerando 97%, 90%, 85% e 80% de similaridade para a formação dos grupos taxonômicos operacionais (UTOs)

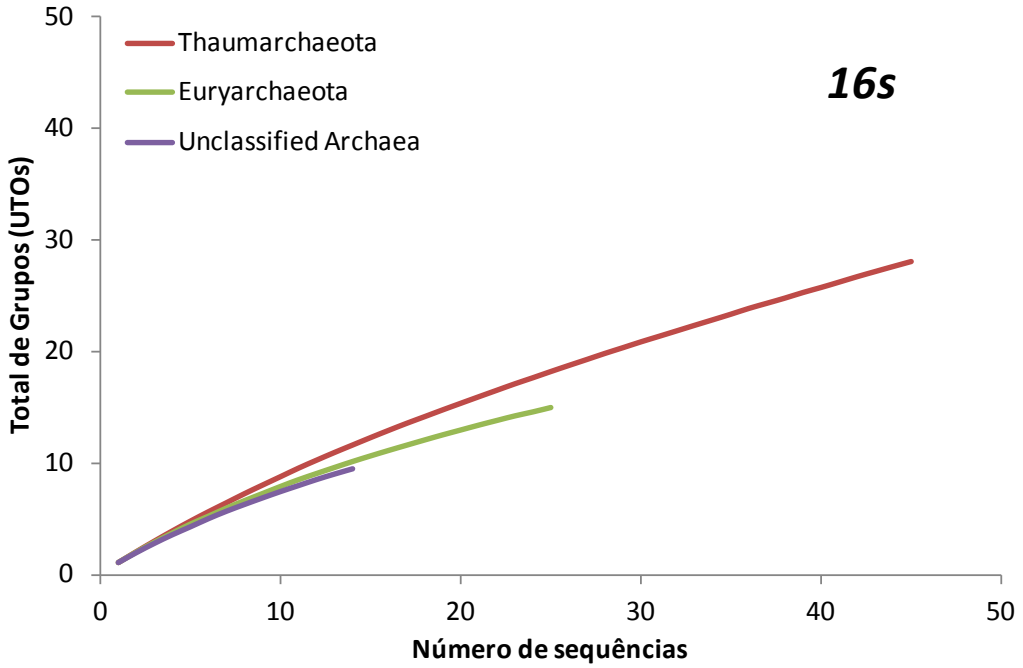


Figura 3.9 - Análise de rarefação das sequências obtidas para o gene 16S de arquéias, considerando 97% de similaridade para a formação dos grupos taxonômicos operacionais (UTOs)

3.3.6 Determinação da filogenia de arquéias nos manguezais avaliados por pirosequenciamento

A análise com os dados gerados pelo pirosequenciamento foi feita para as sequências dos gene 16S DNAr afiliadas dentro do domínio Archaea. O número de sequencias filtradas de cada ponto amostrado (aproximadamente 5.000 sequências) se mantiveram similares entre as duplicatas dos locais investigados, apresentando tamanho médio de fragmentos de 118 pares de bases.

Os filos que foram encontrados representantes desta comunidade foram Crenarchaeota (média de 48,6%), Euryarchaeota (média de 42,6%) e arquéias não classificadas (média de 8,7%) (Figura 3.10a). Os valores de frequência de ocorrência de tais filos foram similares dentro das áreas estudadas. Recentemente, foi proposto um desmembramento do grupo Crenarchaeota, dando origem ao filo chamado Thaumarchaeota, caracterizado por englobar as arquéias amônio-oxidantes. No entanto, a classificação usada neste trabalho ainda não usa a separação destes filos, o que limita a nossa inferência sobre a ocorrência de tais grupos nos sedimentos estudados.

Todas as sequências classificadas como Crenarchaeota no presente estudo foram afiliadas a classe Thermoprotei. As ordens que compuseram essa única classe foram Thermoproteales, Desulfurococcales, Acidilobales e Sulfolobales. Dentre eles, Desulfurococcales apresentou mais sequências (72%), seguido de Thermoproteales (18%), Acidilobales (7%) e Sulfolobales (2%) (Figura 3.10b).

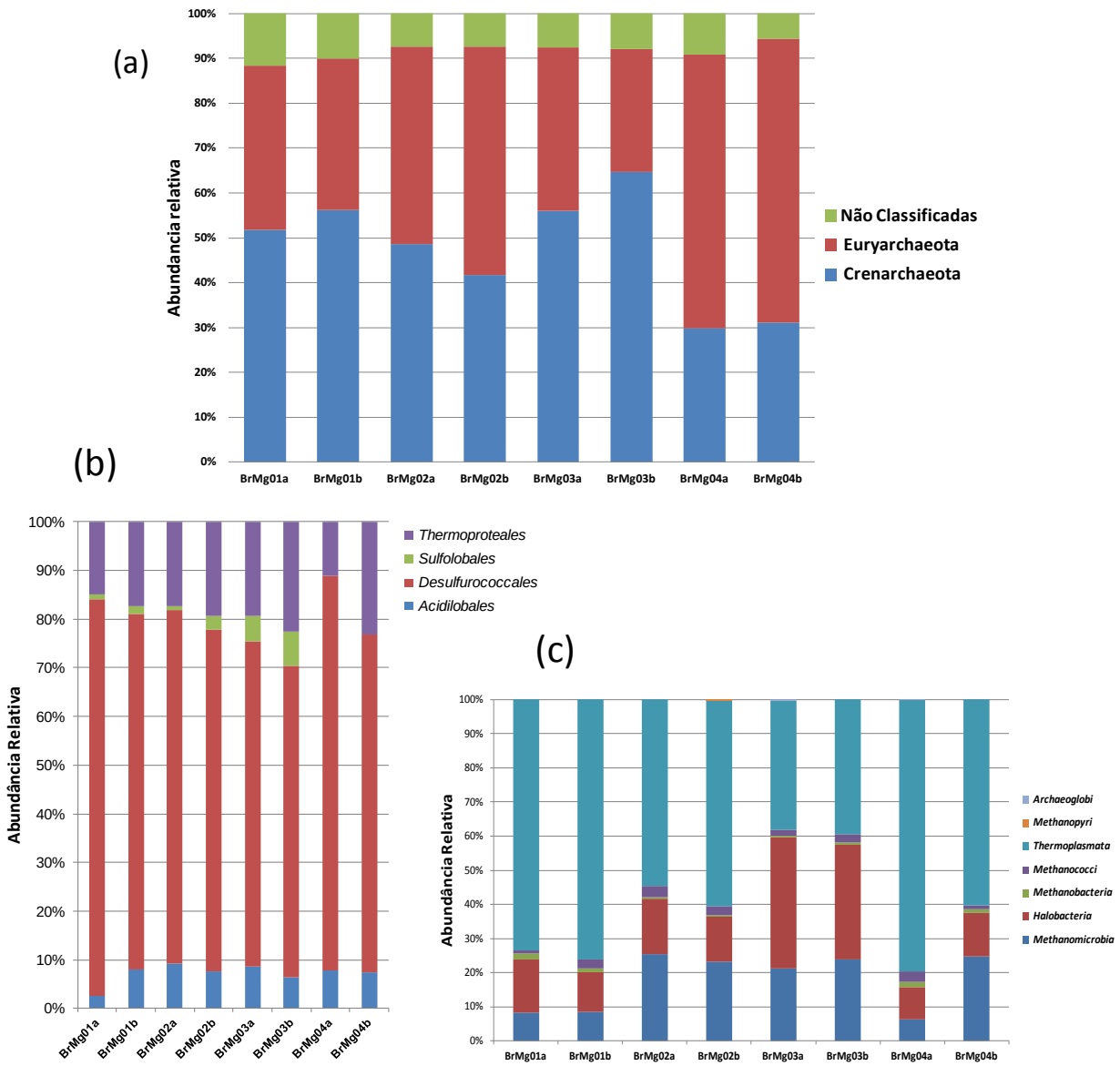


Figura 3.10 - Distribuição de arquéias por meio de pirosequenciamento. (a) Distribuição de arquéias avaliada a nível taxonômico de Filo; (b) Filo Crenarchaeota, classe Thermoprotei e suas ordens; (c) Filo Euryarchaeota e suas classes

As sequências pertencentes ao filo Euryarchaeota representaram cerca de 41,01%. Dentro deste filo, a classe Thermoplasmata foi a mais abundante (76,2%). As outras classes presentes em menor quantidade nos sedimentos foram Halobacteria (26,6%), Methanomicrobia (23,7%), Methanococci (2,9%), Methanobacteria (1,0%), Archaeoglobi (0,11%) e Methanopyri (0,05%) (Figura 3.10c). Destaca-se neste grupo a grande ocorrência de grupos relacionados ao processo de metanogênese.

Em relação às separações entre as áreas, pode-se observar considerando apenas as amostras de Bertioga, um incremento na abundância relativa de sequências afiliadas a Euryarchaeota na área contaminada com petróleo (BrMgv02) e na área do manguezal da Ilha do Cardoso – Cananéia (BrMgv04). De maneira mais detalhada, dentro da ordem Termoprotei, houve grande domínio em todos os locais amostrados da classe dos Desulfurococcales. Levando em consideração as classes do filo Euryarchaeota, o grupo das Archaeoglobi tiveram sua maior abundância nos manguezais com derramamento de óleo e no preservado (BrMgv01 e BrMgv04) e o grupo Halobacteria que tiveram sua maior incidência na área do manguezal de Bertioga sem derramamento (BrMgv03) (Figura 3.10). Na área de maior contaminação de petróleo (BrMgv02) ocorreu um incremento na frequência de sequências afiliadas a Methanomicrobia.

3.4 DISCUSSÃO

A diversidade e complexidade das comunidades microbianas tem sido descrita em uma ampla variedade de ambientes, onde estes organismos são envolvidas em funções distintas que ajudam manter os ecossistemas. Neste contexto, as comunidades de arquéias presentes em manguezais têm grande importância nos mais diversos processos deste ecossistema, onde participam dos ciclos biogeoquímicos, fornecendo a base metabólica responsável pelo desenvolvimento das plantas e animais. Alguns estudos avaliaram a diversidade microbiana em manguezais, relatando os grupos existentes neste ambiente, e avaliando impactos ambientais sobre as comunidades residentes neste ecossistema (LIANG et al., 2007; GOMES et al., 2008; ZHOU et al., 2008). Porém, comparado a outros ambientes, os estudos em manguezais são escassos na maioria das áreas onde estes ocorrem. Dessa forma, o presente capítulo busca contribuir na descrição da diversidade filogenética e funcionalidade de arquéias em três manguezais localizados no Estado de São Paulo.

Considerando os manguezais amostrados, diversas situações de conservação são encontradas, o que permite cobrir a diversidade microbiológica presente neste ambiente em diferentes situações de contaminação antropogênica ou industrial. Os resultados encontrados devem desta forma se somar a prévios estudos, que avaliaram o efeito da contaminação antropogênica em manguezais

(GOMES et al., 2008), e o efeito do derramamento de óleo em tais áreas (SANTOS et al., 2011a). Porém, este trabalho adiciona a avaliação da diversidade intra-manguezais, amostrando e avaliando a diversidade em diferentes micro-ambientes, que ocorrem dentro de um mesmo manguezal. Os resultados das análises físico-químicas suportam este tipo de análise, indicando a composição diferencial do sedimento dos manguezais nas áreas amostradas, onde os principais parâmetros que variam são a quantidade de matéria orgânica, condutividade elétrica e salinidade.

Os resultados de quantificação por PCR em tempo real evidenciam a resposta quantitativa dos grupos microbianos às alterações ambientais encontradas, de maneira semelhante às alterações nos perfis de ocorrência de plantas. Isto é observado na quantificação de arquéias oxidadoras de amônio (gene *amo*A), onde a quantificação deste gene mostrou sua ocorrência apenas em pontos dos manguezais de Bertioga, sendo que na área contaminada este gene não foi detectado. Isto nos remete diretamente à necessidade de oxigênio disponível para o processo de oxidação do amônio. Ou seja, considerando que a contaminação por petróleo limita ainda mais a disponibilidade de O_2. Nestes pontos (ponto 2 e ponto 3 do manguezal de Bertioga com contaminação), estas populações são reprimidas, ocorrendo tal processo apenas na área livre de contaminação (ponto 1) e no manguezal de Bertioga sem contaminação por petróleo, onde o gene *amo*A de origem arqueana foi detectado e quantificado eficientemente. Apesar de algumas tentativas, o gene *amo*A de origem bacteriana não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas.

Em relação à diversidade microbiana encontrada nas amostras avaliadas, os diferentes perfis de DGGE mostraram a composição destas comunidades, e suas respostas às alterações ambientais, que atuam dessa maneira, não apenas na quantidade das populações que às compõem, mas também na estruturação de tais comunidades. As alterações encontradas entre os manguezais amostrados corroboram dados anteriores (GOMES et al., 2008), indicando que diferentes tipos de contaminação podem levar a alterações nas comunidades microbianas presentes nos manguezais. Além disso, as análises de correlações entre variáveis ambientais e a estrutura das comunidades microbianas quantificou de maneira precisa a variação inter e intra-manguezais. Isto permitiu observar quais porções da

comunidade microbiana são responsivas a tais fatores, possivelmente dando suporte a estudos futuros de bioindicadores de contaminação de manguezais.

O estudo de diversidade das comunidades alvo, com o sequenciamento de clones permitiram a afiliação taxonômica das sequências obtidas, suprindo informações sobre a filogenia de grupos microbianos residentes nos manguezais avaliados. Podemos atribuir a presença dos grupos encontrados a sua capacidade de adaptação ao ambiente variável em condições de salinidade e anaerobiose encontradas em manguezais (KATHIRESAN et al., 2001; HOLGUIN et al., 2006). Considerando os resultados do pirosequenciamento neste sentido, temos que o aumento de sequências afiliadas a Euryarchaeota na área de maior contaminação com petróleo pode estar associado ao incremento na densidade populacional de grupos relacionados ao processo de metanogênese, que tem sua atividade melhor desempenhada em condições mais restritas de anaerobiose, como a promovida pela cobertura da superfície do manguezal por uma camada de hidrocarbonetos.

Adicionalmente, se compararmos os dados de afiliação taxonômica deste estudo com o trabalho de Yan et al. (2006), realizado em um manguezal na China, é observada uma congruência parcial dos dados. Porém, a frequência de sequências afiliadas aos filos Crenarchaeota e Euryarchaeota variaram. Este fato nos remete diretamente a biogeografia de manguezais, mostrando que apesar da forte pressão de seleção causada pelas condições ambientais de um manguezal, sua localização também é determinante na composição da comunidade microbiana presente neste ecossistema.

A técnica de pirosequenciamento mostrou-se eficaz na cobertura dos micro-organismos do grupo dos Crenarchaeota (que tem grande parte mais atualmente alocado dentro de Thaumarchaeota), que é um filo composto por organismos amplamente distribuídos em ambientes marinhos e terrestres (HERSHBERGER et al., 1996), o que o faz também bastante diverso filogeneticamente (PESARO; WIDMER, 2002). Tem sido mostrado que estes micro-organismos são os mais abundantes em ecossistemas terrestres (DELONG, 1998), sendo os solos tipicamente dominados por alguns grupos deste filo (AUGUET et al., 2009), contendo membros possivelmente responsáveis pelo processo de nitrificação no solo (LEININGER et al., 2006; NICOL; SCHLEPER, 2006).

Os organismos alocados no filo Euryarchaeota foram acessados mostrando sua versatilidade em utilizar via degradação anaeróbica compostos derivados para

origem de metano (LUTON et al., 2002), sendo o manguezal onde ocorrem todos os pre-requisitos para que tais organismos tenham sua atividade desempenhada (WOESE et al., 1990).

Em relação à filogenia das sequências de AOA e as localizações dos manguezais, este estudo mostrou sequências que foram semelhantes aos de água e também de solo/sedimento. O equilíbrio entre a oxidação de amônia realizada por arquéias e bactérias é descrito como divergente em diferentes ambientes, com o predomínio de um grupo sobre o outro, dependendo das características do ambiente (BEMAN et al., 2008; ERGUDER et al., 2009.). Bernhard et al. (2010) constataram que as arquéias amônio oxidantes predominam sobre bactérias em ambiente estuarino e que a maioria dos genes *amo*A estão relacionados a outros ambientes marinhos e estuarinos. De forma controversa, Glaser et al. (2010) descobriram que as bactérias predominam sobre as arquéias na oxidação de amônia a partir do solo e da rizosfera de cevada, onde a maioria dos clones de arquéias AOA foram posicionados no cluster do solo/sedimento e não no marinho. Li et al. (2010) avaliaram a diversidade de arquéias amônio oxidantes e bactérias em sedimentos de manguezais, encontrando sequências de *amo*A afiliadas em domínios de água do mar, resíduos e sedimentos estuarinos. Este estudo corrobora os nossos resultados, onde a co-ocorrência destes grupos indica que a localização de manguezal, como uma transição mar/solo, que serve como abrigo para ambos os conjuntos de genes *amo*A. Além disso, outra observação feita neste estudo, é a presença de genes possivelmente específicas *amo*A em manguezais, o que é também reportado na literatura (LI et al., 2010). No presente estudo, a formação de dois clusters (25 sequências) separados a partir de sequências *amo*A com valores elevados de *bootstrap* foram observados, indicando uma possível seleção dos sedimentos de manguezais sobre a estrutura da gene *amo*A.

Resultados semelhantes foram obtidos por Taketani et al. (2010), avaliando arquéias metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato nos sedimentos de manguezal preservado. Esses autores encontraram sequências de metil coenzima-M redutase (*mcr*A) e sulfato de dissimilatória redutase (*dsr*B) com baixas similaridades aos descritos em outros ambientes. Corroborando com a hipótese de que os manguezais contêm uma diversidade específica de organismos e estruturas alternativas de enzimas, capazes de promover as suas atividades nas condições ambientais encontradas nestes ecossistemas.

3.5 CONCLUSÕES

Este capítulo acessou a diversidade de arquéias existente em solos de manguezais com diferentes níveis de perturbação no Estado de São Paulo, e gerou informações que permitem concluir que:

- as estruturas das comunidades de arquéias respondem com alterações nas densidades populacionais, às alterações causadas pela contaminação dos manguezais, enquanto que o grupo específico das arquéias amônio oxidantes não se altera estruturalmente nas áreas estudadas;
- a quantificação do gene 16S DNAr de arquéias mostrou abundância uniforme em todas as áreas amostradas (aproximadamente 10^8 cópias por grama de solo), enquanto que a quantificação do gene amoA revelou alterações entre as áreas, sendo a ocorrência de tal gene inibida devido a contaminação dos manguezais de Bertioga com petróleo;
- a filogenia das arquéias mostrou que os manguezais abrigam organismos dos filos Crenarchaeota/Thaumarchaeota e Euryarchaeota, além de grupos alocados como arquéias não classificadas;
- a filogenia do gene *amo*A a ocorrência de grupos relacionadas com aqueles que ocorrem solos e em ambiente marinho; além de revelar grupos de sequências únicas encontradas neste ambiente;

Com base em tais conclusões, tem-se como principal mensagem deste capítulo uma maior análise da comunidade de arquéias em manguezais, aumentando nosso conhecimento sobre este grupo, indicando ainda que tais comunidades são responsivas a modificação dos manguezais, causada pela pressão exercida por atividades antropogênicas.

REFERÊNCIAS

ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 417-432, 2009.

AUGUET, J.-C.; BARBERAN, A.; CASAMAYOR, E.O. Global ecological patterns in uncultured archaea. **ISME Journal**, New York, v. 4, p. 182–190, 2009.

BEMAN, J. M.; POPP, N. P.; FRANCIS, C. A. Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. **ISME Journal**, New York, v. 2, p. 429–441, 2008.

BERNHARD, A. E.; LANDRY, Z. C.; BLEVINS, A.; DE LA TORRE, J. S.; GIBLIN, A. E.; STAHL, D. A. Abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria along an estuarine salinity gradient in relation to potential nitrification rates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 76, p. 1285–1289, 2010.

DeLONG, E. F. Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles'. **Current Opinion in Genetics & Development**, Philadelphia, v. 8, p. 649–654, 1998.

DUKE, N. C.; MEYNECKE, J. O.; DITTMANN, S. A world without mangroves? **Science***,* Washington, DC, v. 317, p. 41–42, 2007.

ERGUDER, T. H.; BOON, N.; WITTEBOLLE, L.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 33, p. 855–869, 2009.

FASANELLA, C. C.; DIAS, A. C. F.; RIGONATO, J.; FIORE, M. F.; SOARES, J. R. F. L.; MELO, I. S.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; VAN ELSAS, J. D.; ANDREOTE, F. D. The selection exerted by oil contamination on mangrove fungal communities. **Water, Air & Soil Pollution**, Dordrecht, 2012. Doi: 10.1007/s11270-012-1187-4.

FRANCIS, C. A.; ROBERTS, K. J.; BEMAN, J. M.; SANTORO, A. E.; OAKLEY, B. B. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, DC, v. 102, p. 14683–14688, 2005.

GOMES, N. C. M.; BORGES, L. R.; PARANHOS, R.; PINTO, F. N.; MENDONÇA-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.

GLASER, K.; HACK, E.; INSELSBACHER, E.; STRAUSS, J.; WANEK, W.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; SESSITSCH, A. Dynamics of ammoniaoxidizing communities in barley-planted bulk soil and rhizosphere following nitrate and ammonium fertilizer amendment. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 74, p. 575–591, 2010.

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

HOLGUIN, G.; ZAMORANO, P. G.; BASHAN, L. E. D.; MENDOZA, R.; AMADOR, E.; BASHAN, Y. Mangrove health in an arid environment encroached by urban development — a case study. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 363, p. 260–274, 2006.

KRISTENSEN, E.; JENSEN, M. H.; BANTA, G. T.; HANSEN, K.; HOLMER, M. G.; KING, M. Transformation and transport of inorganic nitrogen in sediments of a southeast Asian mangrove forest. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf, v. 15, p. 165-175, 1998.

LEININGER, S.; URICH, T.; SCHLOTER, M.; SCHWARK, L.; QI, J.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I.; SCHUSTER, S.C.; SCHLEPER, C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, London, v. 442, p. 806-809, 2006.

LI, M.; CAO, H.; HONG, Y.; GU, J. D. Spatial distribution and abundances of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia oxidizing bacteria (AOB) in mangrove sediments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 89, p. 1243–1254, 2010.

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**, Berlin, v. 150, p. 739–747, 2007.

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**, Reading, v. 148, p. 3521-3530, 2002.

MOYER, C. L.; TIEDJE, J. M.; DOBBS, F. C.; KARL, D. M. Diversity of deep-sea hydrothermal vent Archaea from Loihi Seamount, Hawaii. **Deep-sea Research**, Amsterdam, v. 45, p. 303-317, 1998.

NICOL, G. W.; SCHLEPER, C. Ammonia-oxidizing Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 14, p. 207–212, 2006.

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

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.

SAHAN, E.; MUYZER, G. Diversity and spatio-temporal distribution of ammonia-oxidizing *Archaea* and *Bacteria* in sediments of the Westerschelde estuary. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 64, p. 175–186, 2008.

SANTOS, H. F., CARMO, F. L., PAES, J. E., ROSADO, A. S., PEIXOTO, R. S. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. **Water, Air & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 216, p. 329–350, 2011.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community- supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

TAKETANI, R. G.; FRANCO, N. O.; ROSADO, A. S.; VAN ELSAS, J. D. Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. **Journal of Microbiology**, Seoul, Korea, v. 48, p. 7–15, 2010.

TREUSCH, A. H.; LEININGER, S.; KLETZIN, A.; SCHUSTER, S. C.; KLENK, H.; SCHLEPER, C. Novel genes for nitrite reductase and amo related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 1985–1995, 2005.

VAN RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; ANDRADE, J. C.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2001. 285 p.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

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

ZHOU, H. W.; LUANC, T. G.; ZOUB, F.; TAM, N. F. Y. Different bacterial groups for biodegradation of three- and four-ring PAHs isolated from a Hong Kong mangrove sediment. **Journal of Hazard Materials**, Amsterdam, v. 152, p. 1179–1185, 2008.

4 Diversidade de Bactérias Totais e Fixadoras de Nitrogênio em Sedimentos de Manguezais

Resumo

A microbiologia é uma área de extrema importância em estudos ecológicos nos manguezais, onde este tema é ainda pouco explorado. Neste intuito, apresentamos um levantamento realizado com amostras de sedimentos de manguezais, coletados de diferentes pontos em dois manguezais localizados na cidade de Bertioga (SP, Brasil), com diferentes históricos de perturbação. As estruturas das comunidades de bactérias totais (16S DNAr) e dos grupos relacionados a fixação biológica do nitrogênio (*nif*H) foram avaliados de maneira independente de cultivo. A análise de genes ribossomais por DGGE mostrou alterações na composição das comunidades bacterianas encontradas em diferentes manguezais, alem de indicar uma alteração intra-manguezal na área contaminada por petróleo. Estas mesmas separações foram observadas para os perfis de DGGE com base no gene *nif*H. A determinação da filogenia bacteriana, feita por pirosequenciamento, evidenciou a dominância de Proteobacteria, com destaque para a grande quantidade de sequências afiliadas a Deltaproteobacteria. Em relação ao gene *nif*H, apesar de não ter sido observado diferenças na quantidade de tal gene nas áreas amostradas, a filogenia do gene mostrou a ocorrência diferencial dos grupos bacterianos fixadores de nitrogênio nas áreas estudadas (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria, Firmicutes, bactérias anaeróbicas redutoras de sulfato, além de um grupo de sequências baixa similaridade àquelas encontradas nos bancos de dados). Os resultados indicam que as mudanças observadas na estrutura da comunidade de bactérias, e de fixadoras de nitrogênio, se correlacionam a preservação dos manguezais, e que alterações também podem ocorrer dentro de um mesmo manguezal, quando sujeito a um gradiente de contaminação.

Palavras chaves: Bactéria fixadora de nitrogênio. PCR-DGGE. *nif*H.

ABSTRACT

The microbiology in an extreme important area in ecological studies in mangroves, where this theme is still little explored. In this context, we present a survey made with sediments samples, collected at different points in two mangroves located in the city of Bertioga (SP, Brazil), with different history of perturbation. The strucutre of bacterial community (16S rDNA) and the subset related with biological nitrogen fixation (*nif*H) were evaluated by culture-independent approaches. The analysis of ribossomal genes by DGGE revealed alterations in the composition of bacterial communities in distinct mangroves, and also indicated an intra-mangrove alteration in the area contaminated by the oil spill. The same separation was observed for the DGGE patterns based on gene *nif*H. The phylogenetic analysis of bacteria, made by pyrosequencing, evidenced the dominance of Proteobacteria, with a remark for the great number of sequences affiliated with Deltaproteobacteria. Concerning the gene *nif*H, although the quantification of this gene indicated absence of statistic differences among the sampled area, the gene phylogeny revealed the differential occurrence of taxonomical groups of nitrogen fixers in the studied areas (Alphaproteobacteria, Betaprotoebacteria, Gammaproteobacteria, Firmicutes, sulphate-reducers anaerobic bacteria, and a group with low similarity with sequences found in the databases). The results indicate that changes observed in the structure of bacterial community, and in the nitrogen fixers community, are related with the state of mangrove preservation, and show also that differences may occur within one mangrove, when it is exposed to a gradient of contamination.

Key-words: Nitrogen-fixing bacteria. PCR-DGGE, *nif*H.

4.1 Introdução

O manguezal é um ambiente único, que ocorre em regiões tropicais e subtropicais do planeta. Devido a sua localização, importância e alta susceptibilidade à degradação, estudos microbiológicos deste ecossistema são importantes e urgentes. Apesar da ampla descrição de espécies de plantas e animais residentes em manguezais, os micro-organismos presentes neste ecossistema foram ainda pouco explorados (HOLGUIN et al., 2001; CLEARY et al., 2011). Porém, é conhecida a importância da comunidade microbiana na manutenção deste ecossistema, onde esta participa ativamente da ciclagem de nutrientes, por meio do processamento da matéria orgânica, suprindo nutricionalmente as plantas e animais que vivem nos manguezais (DUKE et al., 2007; DIAS et al., 2010). Um importante ponto dentro deste contexto é a entrada de nitrogênio neste ambiente, promovida parcialmente por Micro-organismos fixadores do nitrogênio atmosférico. Flores-Meireles et al. (2007) acessaram a diversidade bacteriana da rizosfera de árvores de mangue, onde a estrutura das comunidades diazotróficas foram determinadas, sendo os padrões de diversidade encontrados em resposta às características biogeoquímicos do ambiente.

Este estudo demonstra que entender como estes Micro-organismos e sua funcionalidade respondem às alterações ambientais presentes em diversos manguezais, ou mesmo em diferentes pontos dentro de um mesmo manguezal, pode auxiliar no entendimento deste ecossistema, servindo como suporte a projetos de pesquisa que visem a bioprospecção em manguezais (SANTOS et al., 2011b) e a preservação de tal ambiente.

Neste trabalho foram utilizadas técnicas independentes de cultivo para acessar parte da microbiota presente em sedimentos de manguezais, com o objetivo de evitar os problemas de seleção inerentes ao cultivo de Micro-organismos a partir de amostras ambientais. Assim, tais técnicas propiciam um melhor entendimento da composição das comunidades bactérias totais e fixadoras de nitrogênio em dois manguezais do Estado de São Paulo (ambos localizados na cidade de Bertioga). Os resultados obtidos nesse capítulo mostram que diferentes manguezais hospedam comunidades de bactérias totais e fixadoras de nitrogênio distintas, indicando uma

forte pressão de seleção sobre tais comunidades de acordo com os estado de preservação do mangue, exigindo um grande potencial adaptativo e adequação das espécies para a colonização deste ecossistema.

4.2 DESENVOLVIMENTO

4.2.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1.1 Manguezais e amostras avaliadas

No presente capítulo foram avaliadas as amostras obtidas dos dois manguezais localizados na cidade de Bertioga, como descrito no capitulo anterior. Resumidamente, um manguezal tem como fator externo apenas um baixo efeito antrópico, enquanto que o outro sofreu o impacto causado por derramamento de 35 milhões de litros petróleo no ano de 1983 (mais detalhes apresentados no capítulo anterior). Sendo tais análises compostas apenas por amostras destes dois manguezais, o número de amostras analisadas foi de 18 amostras (2 manguezais x 3 pontos x 3 repetições).

Também de maneira similar, a análise de pirosequenciamento foi feita para um número menor de amostras, agrupando as diferentes áreas como descrito no capítulo 1; BrMgv01 - localizada no manguezal de Bertioga com derramamento de óleo mas livre de contaminação (ponto1); BrMgv02 - composta de um *pool* das replicatas do ponto 2 e 3 com maior incidência de petróleo; e BrMgv03 – composta por todas as amostras do outro manguezal encontrado em Bertioga (Figura 4.1).

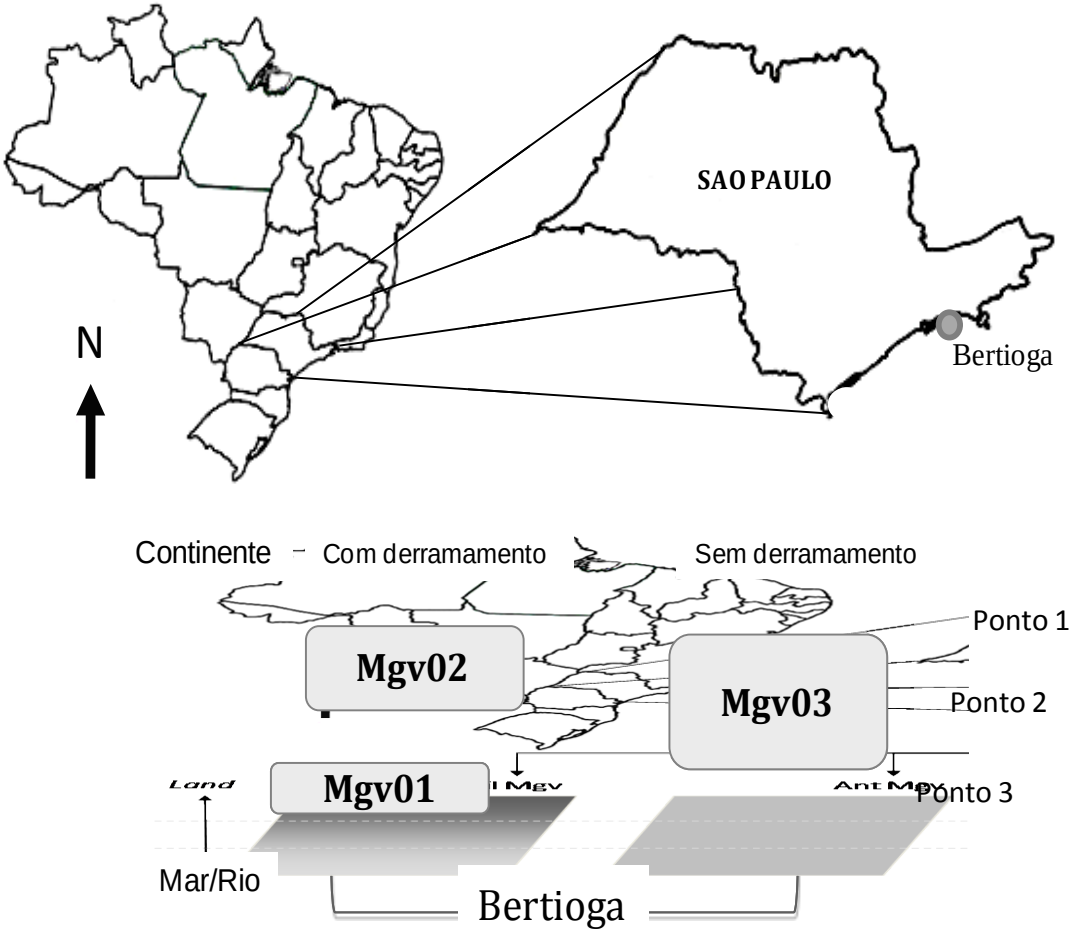


Figura 4.1 - Esquema dos pontos de amostragem em cada manguezal avaliado, evidenciado a cobertura da diversidade nos pontos próximos ao mar ou rio (ponto 1), no centro do manguezal (Ponto 2) e também na área próxima ao continente (Ponto 3)

4.2.1.2 Extração de DNA das amostras de sedimento

A partir de cada uma das amostras, o DNA foi extraído de acordo com metodologia descrita para o *Power Soil DNA Isolation kit* (MoBio, EUA). Após a extração, a integridade e a qualidade dos DNAs obtidos foram verificadas em eletroforese em gel de agarose 1% (w/v), seguida coloração em brometo de etídeo e visualização em luz ultravioleta. Para quantificação dos genes de interesse por PCR em tempo real, os DNAs extraídos foram adicionalmente quantificados por meio da análise em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, EUA).

4.2.1.3 Quantificação do gene *nif*H por PCR em tempo real

As análises de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas para quantificação do gene *nif*H. As reações foram realizadas no equipamento ABI Prism 7300 Cycler (Applied Biosystems, Germany) utilizando o sistema SYBR GreenI. Todas as reações foram realizadas em volume de 25 μl, contendo 12.5 μl do kit *Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Brasil) e 0,2µM dos *primers* FGPH19 (SIMONET et al., 1991) e PolR (POLY et al., 2001).

As amplificações foram realizadas com um ciclo de desnaturação inicial a 95ºC por 5 minutos seguidos de 35 ciclos de amplificação; 94°C por 1 minuto, anelamento de 55°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 1 minuto (TAKETANI et al., 2009). Para todas as reações, uma curva de desnaturação foi realizada, com temperatura variando entre 60º à 96ºC para verificar a especificidade da amplificação.

Para a quantificação absoluta do gene *nif*H alvo nas amostras, curvas padrões foram obtidas, realizando amplificações com o número de cópias conhecidas do DNA molde (*Bradyrhizobium liaoningense*), adicionadas nas reações em diluições seriais (10^2-10^7 cópias por reação). Desta maneira, os dados da amplificação do DNA extraído de amostras ambientais (Ct) foram interpolados para determinar o número de cópias do gene de interesse nas amostras avaliadas. A amplificação das diferentes diluições do DNA alvo também resultou na geração de dados de eficiência de amplificação e de correlação logarítmica (R^2) entre o número de ciclos e a quantidade de DNA nas amostras.

Os dados de quantificação foram comparados numa análise fatorial, considerando dois manguezais, e três pontos de amostragem dentro de cada área. Após uma análise de variância, a interação entre os elementos foi comparada, bem como a ocorrência de diferenças entre cada uma dos efeitos dentro de cada área ou manguezal.

4.2.1.4 Análise das comunidades de bactérias totais e fixadoras de nitrogênio nos sedimentos de manguezais por meio de DGGE

As análises das estruturas das comunidades de bactérias nas áreas estudadas foram realizadas por PCR-DGGE. O DNA extraído foi utilizado para a amplificação da região V6 do gene 16S DNAr de Bacteria em reação de amplificação com os *primers* U968⊥GC (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TA-3') e 1378R (5'-CGG TGT GTA CAA CGC CCG GGA ACG-3') (HEUER et al., 1997); tamanho do fragmento esperado de 410 pb. As reações foram realizadas em volume de 50 µL, contendo 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µL de formamida (1%), 0,4 mM de cada *primer*, em solução tampão para DNA polimerase Taq contendo 1 U DNA polimerase *Taq* (Fermentas, São Paulo, Brasil) e 1 µL de DNA molde (10 a 20 ng); sendo completado o volume com água ultra pura esterilizada. As condições de amplificação da PCR foram de desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C; seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C, 2 minutos a 72°C; seguidos de uma extensão final por 10 minutos a 72°C.

Para a amplificação do gene *nif*H foram utilizados os *primers* FGPH19 (5'-TAC GGC AAR GGT GGN ATH G-3') (SIMONET et al., 1991) e PolR (5'-ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA-3') (POLY et al., 2001). A amplificação ocorreu em 25 µL de solução contendo: 2,5 µL de 10x tampão *Taq* (20 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,4), 200 mM de KCl, 1 mM de EDTA, 7 mM de mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,2 mg/mL de BSA, Roche), 0,05 µL de BSA, 0,2 µL de 25 mM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), 0,1 µL de 5 U µL-1 de *Taq* DNA Polimerase recombinante (100 mM de Tris-HCl, 15 mM de $MgCl_2$, 500 mM KCl, pH 8,3 (20°C), Roche), 1 µL de cada *primer* (10 pmoles μL^{-1}) e aproximadamente 20 ng de DNA, sendo o restante do volume completado com água ultra pura autoclavada. As condições da amplificação foram: 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 56°C; 2 minutos a 72 °C e 10 minutos a 72°C de extensão final. Os *amplicons* obtidos nesta primeira reação foram utilizados na segunda reação de PCR com os *primers* PolF-GC (Grampo GC 5'-TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC-3') e AQER (5'-GAC GAT GTA GAT YTC CTG-3') (POLY et al., 2001). A amplificação ocorreu em 50 µL de solução contendo: 5 µL de 10x tampão *Taq*

(20 mM tampão fosfato de potássio (pH 7.4), 200 mM de KCl, 1 mM de EDTA, 7 mM de mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,2 mg/mL de BSA, Roche), 0,4 µL de 25 mM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), 0,16 µL de 5 U µL-1 de Taq DNA polimerase recombinante (100 mM de Tris-HCl, 15 mM de MgCl2, 500 mM de KCl, pH 8,3, Roche), 2,5 µL de cada *primer* (10 pmoles µL-1) e 10 ng de DNA, sendo o restante do volume completado com água ultra pura autoclavada. Os ciclos de amplificação foram 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 48°C; 2 minutos a 72 °C e 10 minutos a 72°C de extensão final. As amplificações foram sempre verificadas em gel de agarose 1% antes de serem submetidas à análise de DGGE.

As análises de DGGE foram realizadas no aparelho *Ingeny PhorU2 system* (Ingeny, Goes, Holanda), com gradiente desnaturante variando de acordo com o gene estudado. As soluções estoque utilizadas foram 0 e 80% desnaturantes, onde 100% de desnaturação consiste na concentração de 7 M de uréia e 40% de formamida. Para estudar as comunidades de bactérias totais (*primers* universais) (HEUER et al., 1997), o gel de DGGE foi preparado com soluções de poliacrilamida 6,0%, e o gradiente utilizado foi de 45 a 65%. Para a análise do gene *nif*H, o gel de DGGE foi preparado com soluções de poliacrilamida 6,0%, e o gradiente utilizado foi de 40 a 65%. A eletroforese foi mantida por 16 horas em voltagem constante de 100V numa temperatura de 60°C. Após a eletroforese, todos os géis foram corados com SYBR Gold, concentração final de 0.5 mg L^{-1} (Invitrogen, Breda, Holanda) e foto-documentados em luz ultravioleta.

4.2.1.5 Análise dos resultados dos DGGEs baseados nos genes 16S DNAr e *nif*H

Os perfis de bandas dos géis de DGGE foram transformados em matrizes, onde as bandas observadas nos géis de DGGE foram consideradas como espécies e suas intensidades relativas consideradas como frequência destas espécies. A análise de agrupamento de tais matrizes foi feita por meio de análise dos componentes principais (PCA), realizada no *software* Canoco (Canoco 4.5, Biometris, Wageningen, Holanda).

Adicionalmente, o teste de Mantel foi realizado para se verificar a correlação dos agrupamentos realizados com bases nos dois genes analisados. Com isto espera-se determinar se o grupo das bactérias fixadoras de nitrogênio responde de maneira similar ao grupo total de bactérias às alterações ambientais encontradas nas diferentes amostras analisadas. Isto pode dar suporte à inferência sobre a importância de tal comunidade na estruturação e funcionamento deste grupo na comunidade microbiana em estudo.

4.2.1.6 Análise da comunidade de bactérias por meio do pirosequenciamento parcial do gene 16S DNAr

O sequenciamento das amostras por pirosequenciamento foi realizado através de terceirização do serviço (Helixxa, Campinas, São Paulo, Brasil). Esta técnica se baseia na identificação dos grupos de bactérias presentes em sedimentos por meio do sequenciamento de regiões específicas do gene codificador para o RNA funcional da subunidade 16S do ribossomo. Nesta análise foram avaliadas duas repetições por tratamento. Para tanto, o DNA extraído das amostras foi amplificado com *primers* flanqueadores da região V4 deste gene, usando os primers 520F (5'-AYT GGG YDT AAA GNG-3') e uma mistura de *primers* reversos 802R (5'-TAC CRG GGT HTC TAA TCC-3', 5'-TAC CAG AGT ATC TAA TTC-3', 5'-CTA CDS RGG TMT CTA ATC-3', 5'-TAC NVG GGT ATC TAA TCC-3'), visando amostrar o maior número de grupos bacterianos possíveis dentro da amostra a ser analisada, como descrito no *Ribosomal Database Project* (RDP). Em tais *primers* foram adicionados adaptadores A e B, conforme o manual do fabricante do equipamento (Roche, EUA). Adicionalmente, o *primer* foward usado para cada amostra recebeu uma tag de identificação composta de 6 a 8 bases, que serviu para identificar a origem de cada uma das sequências obtidas.

As sequencias resultantes foram analisadas em relação a sua afiliação taxonômica no *Ribossomal Database Project*, usando a ferramenta *Classifier*, com um valor de *cutoff* de 50% (como recomendado no site do RDP).

4.2.1.7 Construção e análise de biblioteca de clones dos gene *nif*H

Os DNAs obtidos de cada uma das extrações das amostras ambientais foram utilizados na construção de seis bibliotecas de clones do gene *nif*H (uma de cada área amostrada). Os DNAs extraídos foram submetidos à amplificação com *primers* PolF e AQER (POLY et al., 2001), específicos para o gene de interesse, seguido de metodologia previamente descrita. Posteriormente, os produtos de amplificação foram purificados e clonados em plasmídeos de *Escherichia coli* utilizando o kit *pGEM-T Easy Vector System* (Promega, Madison, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As colônias que apresentaram insertos no vetor (coloração branca) foram selecionadas para detecção do inserto, por meio de amplificação com os *primers* M13F e M13R. Os produtos de PCR com o inserto foram enviados e sequenciados na AGOWA (Berlin, Alemanha). Com esta metodologia foram obtidos 489 clones do gene *nif*H. Tais sequências foram analisadas quanto a sua qualidade e as sequências de vetores foram removidas pelo programa Lucy, presente no *pipeline* do *Ribosomal Data Project*.

As análises das sequências foram realizadas inicialmente por filogenia, onde as sequências foram comparadas por *BlastN* contra o banco de dados do *GenBank* (nr/nt). Posteriormente, foi também feita a análise das bibliotecas por meio de aplicação de técnicas descritas na literatura para a análise de bibliotecas de clones, como a determinação de unidades taxonômicas operacionais (UTOs), rarefação e comparação de bibliotecas, utilizando programas como o MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Quantificação do gene *nif*H por qPCR em tempo real em amostras de sedimentos de manguezais

A aplicação da metodologia de qPCR permitiu quantificar o gene alvo nas amostras de sedimentos analisadas. Este sistema foi bastante robusto, resultando na obtenção do valor de eficiência de 99,26%, associado ao valor de regressão logarítmica da curva (R^2) de 0,99. Adicionalmente, a especificidade de amplificação foi avaliada por meio da presença de picos únicos nas análises de desnaturação. Com a validação do sistema de detecção as amostras foram analisadas e a comunidade alvo foi quantificada.

A comunidade de fixadores de nitrogênio mostrou ter densidades similares, não sendo possível detectar valores estatísticos significativos para a interação entre os fatores analisados (p>0,05) (Figura 4.2). No entanto, a variação nos valores de médias (log 6,81 a 8,26) pode indicar que o alto desvio padrão, principalmente encontrado no ponto 1 do manguezal contaminado por óleo, pode ter comprometido esta análise. Assim sendo, trabalhando com base em tendências, pode-se sugerir um incremento na densidade de tal gene nas áreas com maior contaminação dentro do manguezal onde houve o derramamento de petróleo (Figura 4.2). Já no manguezal sem contaminação, a tendência é inversa, com maiores valores observados para a área próxima ao mar (ponto 1).

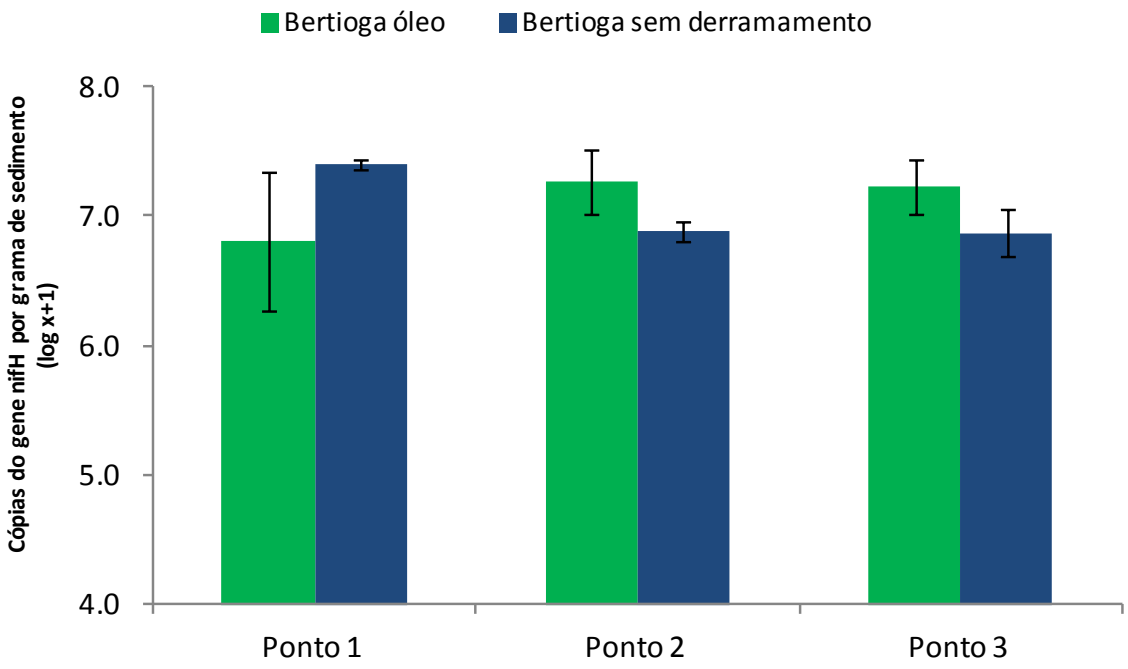


Figura 4.2 - Quantificação do gene *nif*H de bactérias fixadoras de nitrogênio por meio de qPCR, nas diferentes amostras de sedimento analisadas. Os valores indicam a média das três repetições utilizadas; para cada uma delas, duas reações foram realizadas para evitar variações intrínsecas ao equipamento. As barras indicam o erro padrão da média nas diferentes amostras quantificadas

4.3.2 Análise do perfil das comunidades de bactérias totais e fixadoras de nitrogênio por PCR-DGGE

A análise de DGGE permitiu observar a composição das comunidades microbianas nos manguezais avaliados com base em genes marcadores filogenéticos (16S DNAr) e funcionais (*nif*H). O perfil de DGGE para bactérias totais mostrou a grande diversidade e riqueza de espécies presentes nas amostras de sedimentos de manguezais, evidenciado pelo grande número de bandas observado em todas as amostras (Figura 4.3a). No entanto, não foi possível observar visualmente grandes alterações nos perfis obtidos de manguezais distintos; como também alterações na composição da comunidade bacteriana em diferentes pontos amostrados dentro de um mesmo manguezal (Figura 4.3a). Apenas pequenas alterações foram evidenciadas nas amostras oriundas dos pontos 2 e 3 do manguezal de Bertioga contaminado com petróleo (Figura 4.3a). Além da

observação visual destas diferenças, a análise de componentes principais (PCA) evidenciou que a separação das amostras ocorre principalmente devido às alterações observadas entre manguezais. No entanto, ocorreram também separações de amostras de pontos distintos, sendo tal separação mais evidente no manguezal de Bertioga contaminado com petróleo (Figura 4.3b).

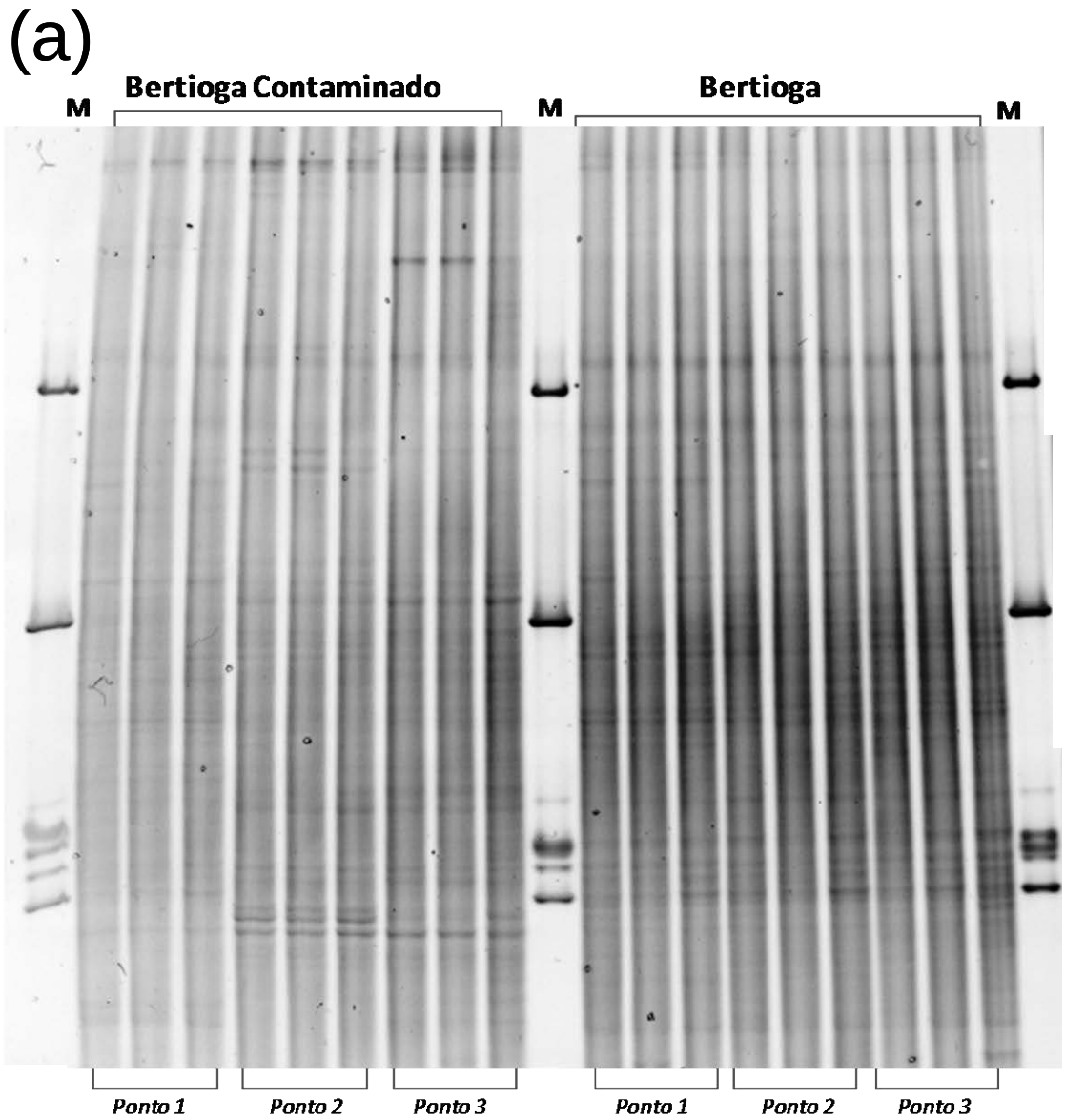


Figura 4.3 - Perfil de DGGE para o domínio Bacteria total (a), nas diferentes amostras de sedimentos avaliadas. M indica as linhas com marcador. Análise de componentes principais (PCA) dos perfis de DGGE de Bacteria (b). Após o nome das amostras, os valores indicam os pontos de coleta e as repetições realizadas em cada ponto. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância total dos dados representada pelo eixo

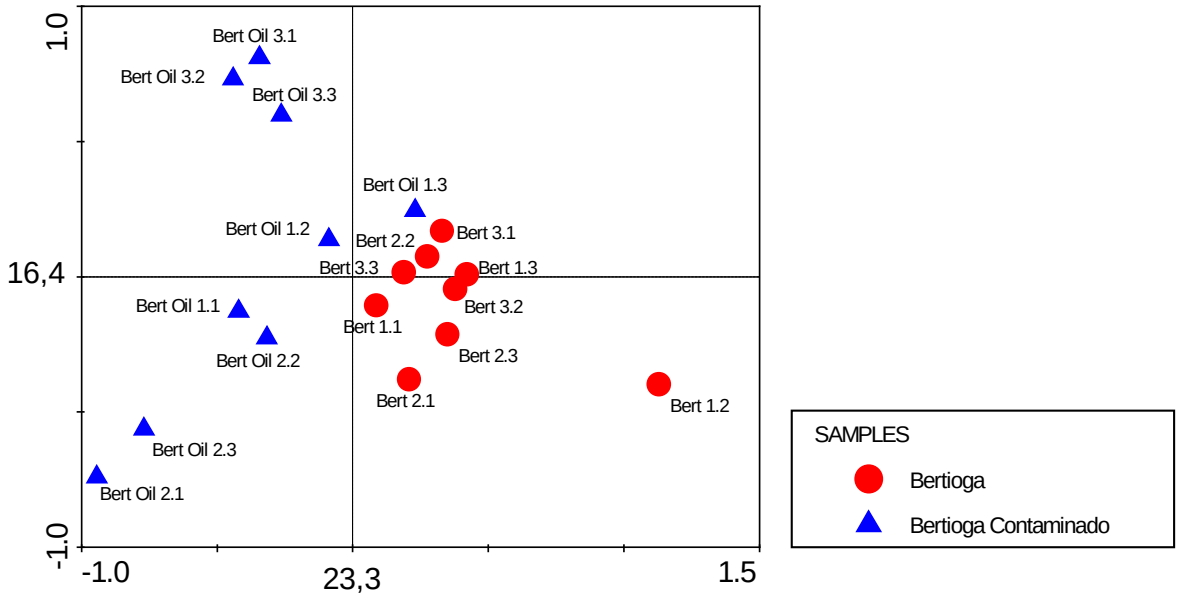


Figura 4.3 - Perfil de DGGE para o domínio Bacteria total (a), nas diferentes amostras de sedimentos avaliadas. M indica as linhas com marcador. Análise de componentes principais (PCA) dos perfis de DGGE de Bacteria (b). Após o nome das amostras, os valores indicam os pontos de coleta e as repetições realizadas em cada ponto. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância total dos dados representada pelo eixo

De maneira similar, os perfis de DGGE com base no gene *nif*H mostrou muitas bandas em todas as amostras avaliadas. Estes perfis foram diferentes qualitativamente e variaram na intensidade das bandas em amostras distintas (Figura 4.4). Assim, tanto alterações na presença de grupos específicos, como na densidade das populações componentes de tal comunidade podem ser observadas (Figura 4.4). Destaca-se ainda nesta análise a alteração no perfil de tal comunidade observada nas amostras coletadas na área de maior contaminação, indicando este evento como determinante para a estruturação de tal comunidade.

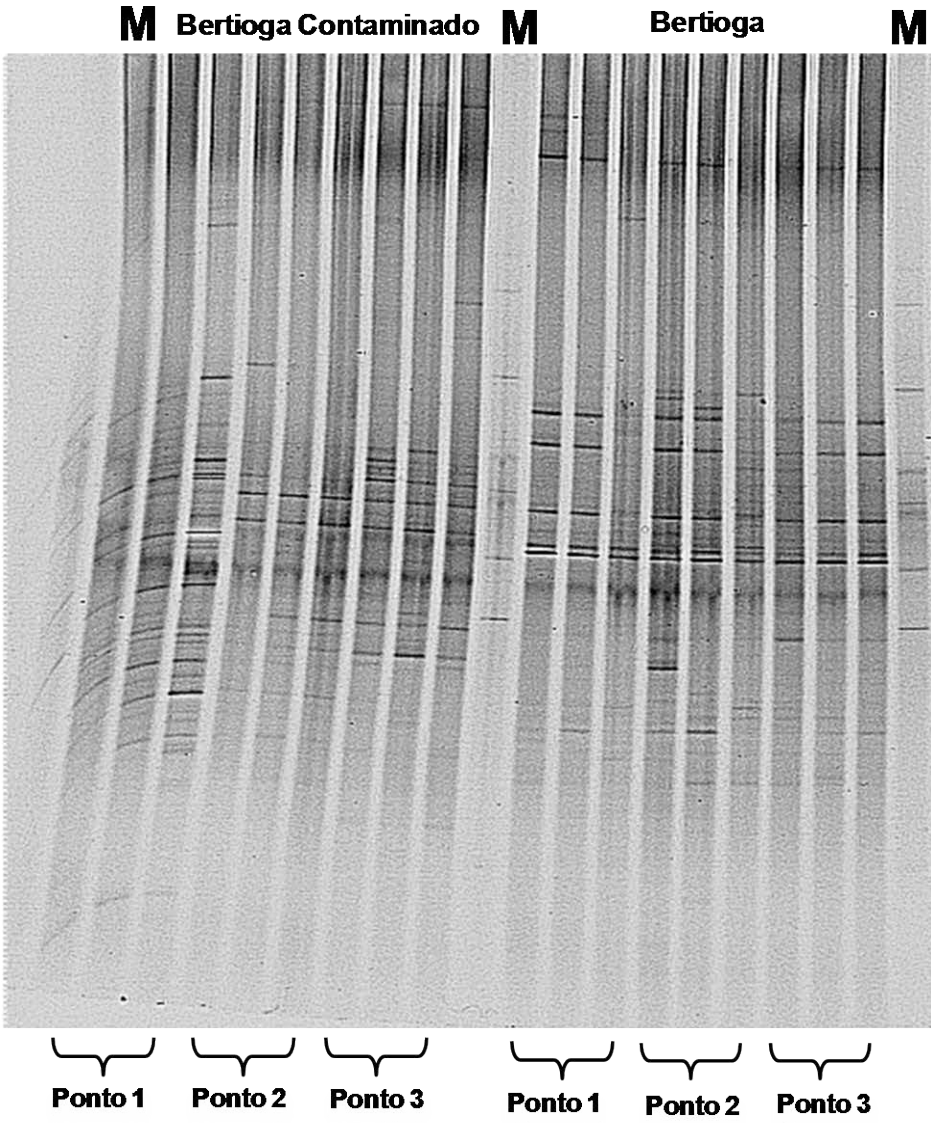


Figura 4.4 - Perfil de PCR-DGGE para bactérias fixadoras de nitrogênio (*nif*H). M indica as linhas com marcador. Acima os nomes dos manguezais amostrados e embaixo os pontos de coleta e as repetições realizadas em cada ponto

Além da observação visual destas diferenças, com a análise de PCA foi possível observar que a separação das amostras ocorre principalmente devido às alterações observadas entre manguezais. Além destas diferenças, ocorreram também separações de amostras de pontos distintos, sendo tal separação mais evidente no manguezal de Bertioga contaminado com petróleo pontos 2 e 3, sendo as amostras do sedimento contaminado do ponto 1 diferente dos demais locais analisados (Figura 4.5).

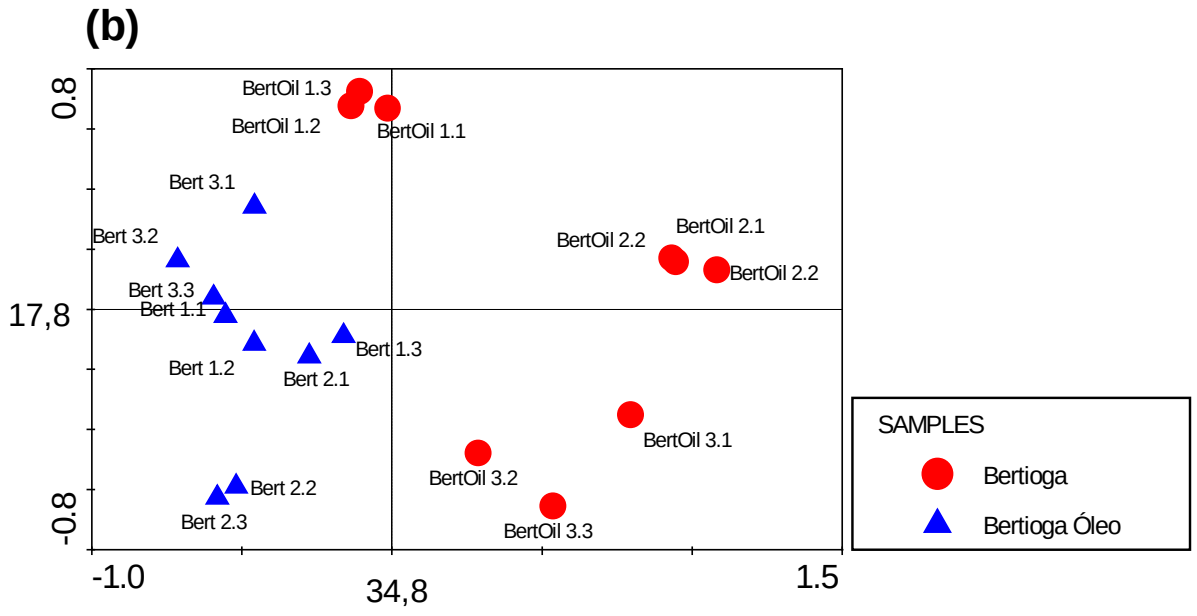


Figura 4.5 - Análise de componentes principais (PCA) dos perfis de DGGE do gene *nif*H. Após o nome das amostras, os valores indicam os pontos de coleta e as repetições realizadas em cada ponto. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância total dos dados representada pelo eixo

Esta similaridade nas separações e similaridades observadas levaram ao uso to teste de Mantel, para comprovar tal correlação. Esta análise indicou um valor de R de 0,49, que indica uma alta correlação positiva entre os agrupamentos realizados com os dois genes estudados neste capítulo.

4.3.3 Determinação da filogenia de bactérias nos sedimentos dos manguezais avaliados

Com o objetivo de confirmar a diferenciação entre as comunidades bacterianas entre os manguezais amostradas, foi realizado o pirosequenciamento da região V4 do gene 16S DNAr de duas amostras de cada uma das três áreas de estudo. Um total de 25.764 sequências foi classificado usando a ferramenta *RDP Classifier* (Figura 4.6).

A composição das comunidades bacterianas foi caracterizada pela classificação taxonômica das sequências (Figura 4.6), onde se encontraram sequências afiliadas a 22 filos bacterianos, sendo a maior parte da comunidade pertencente a bactérias não classificadas (média de 31,33%).

Numa análise geral, o filo mais abundante foi Proteobacteria (27,95% das sequências), com destaque para o predomínio dentro deste filo da Deltaproteobacteria, representando em média 51,25% das sequências alocadas em Proteobacteria (Figura 4.6b). Outras classes com grande abundância nos sedimentos analisados foram Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Epsilonproteobacteria e proteobactérias não classificadas. Os valores médios para a frequência de sequências afiliadas a estes grupos foram de 7,81%, 5,26%, 20,30%, 3,55% e 11,78%, respectivamente. (Figura 4.6b). Dentro da classe Gammaproteobacteria, segunda mais abundante no filo Proteobacteria, a ordem predominante foi Desulfobacterales, que representou 60,31% do total das sequências de Gammaproteobacteria. As outras ordens dentro da classe das Deltaproteobacteria Syntrophobacterales, Desulfovibrionales, Desulfuromonadales, Myxococcales e Bdellovibrionales sendo as frequências de 33,36%, 2,83%, 0,30%, 1,60% 1,61% e 0,43%, respectivamente.

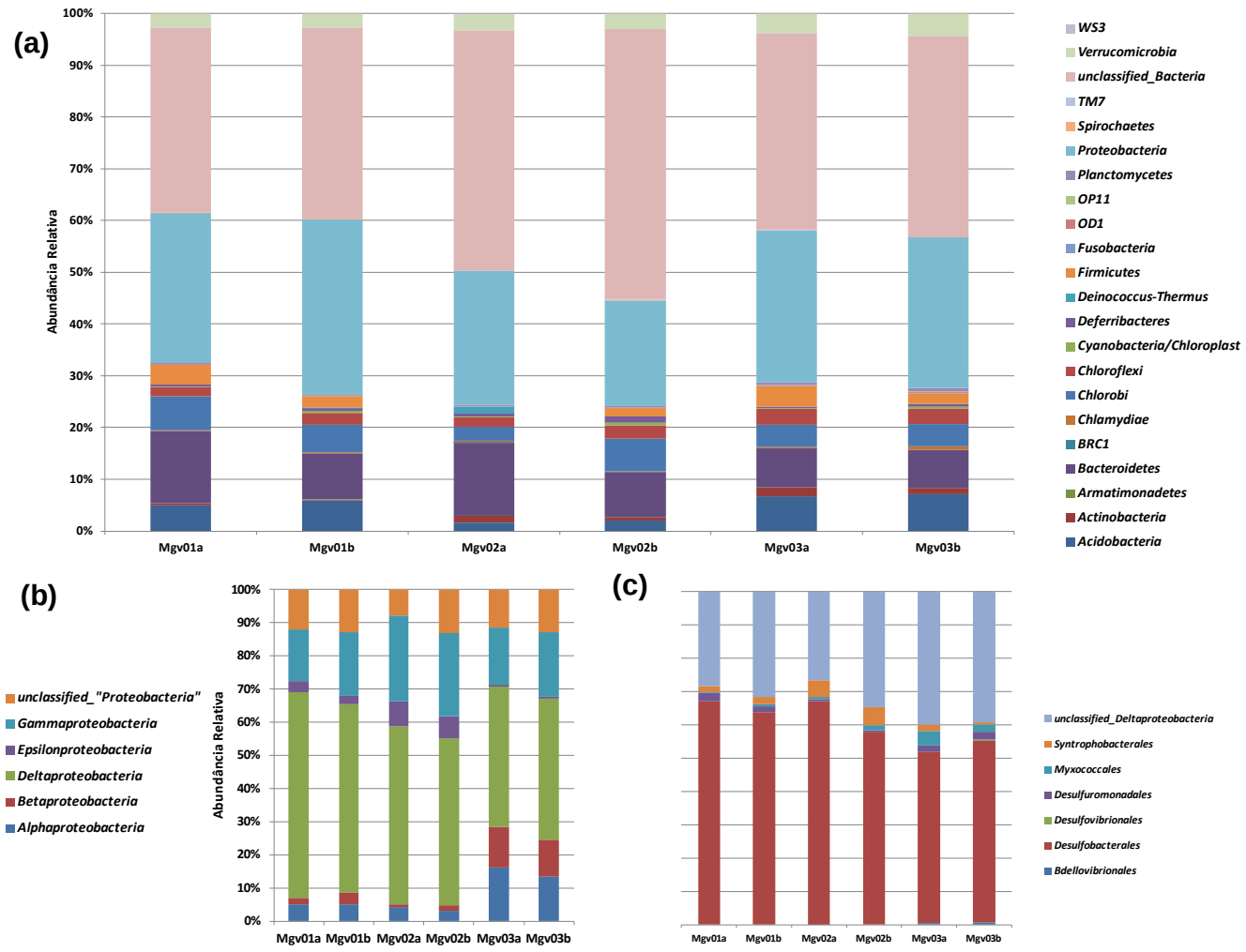


Figura 4.6 - Distribuição de Bacteria ao nível taxonômico de Filo (A); Classes dentro do filo Proteobacteria (B); Ordem dentro da classe Deltaproteobacteria (C)

O segundo filo mais abundante nas áreas amostradas foi o filo Bacteroidetes, representado com 10,06% das sequências de bactérias; o restante das sequências foram atribuídas ao filos Acidobacteria (4,77%), Chlorobi (4,88%), Planctomycetes (4,60%), Verrucomicrobia (3,23%), Chloroflexi (2,46%), Firmicutes (2,26%), Actinobacteria (0,91%), Deinococcus-Thermus (0,40%), Deferribacteres (0,56%). Menos de 0,5% do total das sequências pertencem a outros grupos taxonômicos como Armatimonadetes, Chlamydiae, Cyanobacteria, Fusobacteria, BRC1, OD1, OP11, TM7 e WS3.

Em relação à diferenciação entre as amostras analisadas, houve uma maior frequência de sequências não classificadas nas amostras de áreas contaminadas com petróleo, contrapondo a menor ocorrência de Proteobacteria nesta área (Figura 4.6a), o que também ocorre com Acidobacteria. Os demais filos encontrados ocorreram em frequências semelhantes nas diferentes amostras analisadas. Dentro do filo Proteobacteria, a classe mais abundante foi Deltaproteobacteria, que teve ocorrência similar em todas as amostras, assim como o grupo Betaproteobacteria. Diferenças foram observadas para as demais classes, sendo Gammaproteobacteria e Epsilonproteobacteria mais frequentes em amostras do manguezal contaminado com petróleo, e Alphaproteobacteria apresentando maior ocorrência no manguezal sem derramamento (Figura 4.6b). Dentro do grupo Deltaproteobacterias, a ordem Desulfobacterales ocorreu em maior abundancia, juntamente com Deltaproteobacteria não classificadas. A ocorrência de tais grupos mostrou-se similar entre as amostras analisadas (Figura 4.6c). Uma alteração foi observada para a ordem Syntrophobacterales, que foi mais abundante nas amostras contaminadas com petróleo (Mgv02).

4.3.4 Determinação da filogenia dos genes *nif*H encontrados nos sedimentos dos manguezais avaliados

A filogenia dos grupos taxonômicos que compõem as comunidades microbianas de fixadores de nitrogênio foi determinada por meio da análise de sequências de bibliotecas de clones do gene *nif*H. Numa análise inicial, a dominância taxonômica dentro destas sequências foi verificada para aquelas

afiliadas a Proteobacteria (294 sequências), seguidas de bactérias anaeróbicas/redutoras de sulfato (110 sequências) e Firmicutes (11 sequências). Alem destes grupos já descritos na literatura, um grupo de sequências mostrou baixa similaridade com aquelas presentes no banco de dados, gerando o que foi chamado neste trabalho de Cluster Mgv *nif*H, composto de 74 sequências, que podem possivelmente ser de ocorrência única em sedimentos de manguezais (Figura 4.7).

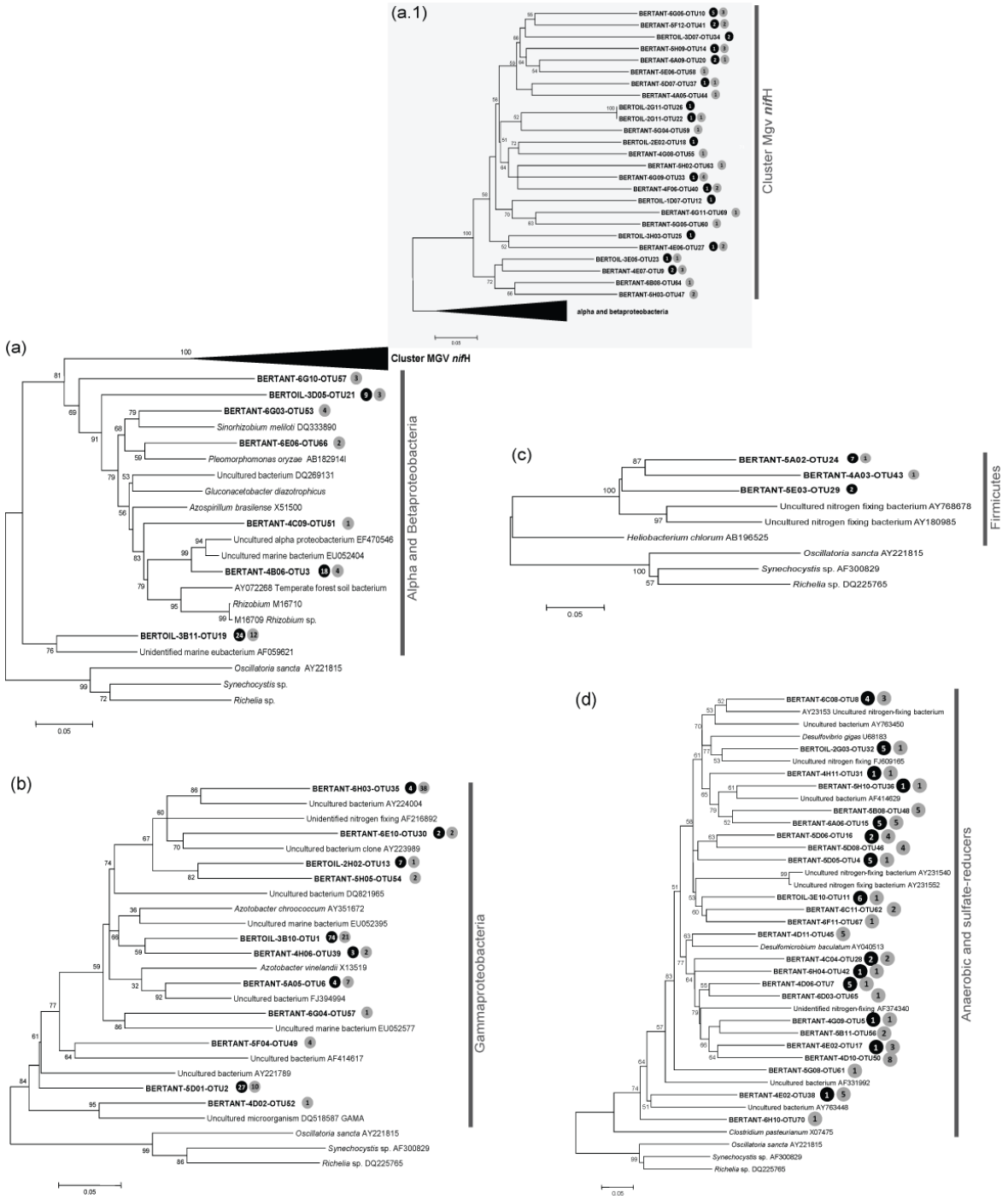


Figura 4.7 - Análise filogenética das sequências pertencentes ao gene *nif*H dos manguezais de Bertioga, sendo (a) sequências relacionados aos grupos Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria; (a.1) sequênicas ditas únicas de sedimentos dos manguezais amostrados (b) Gammaproteobacteria; (c) Firmicutes e (d) bactérias anaeróbicas e redutoras de sulfato. A filogenia foi determinada pelo método de Kimura-2, e as dissimilaridades encontradas são representadas pelas distâncias nos ramos. A sequência de DNA utilizada para a análise foi de 416 pares de base. Os valores de *bootstrap* maiores do que 50 são indicados nos ramos

Com relação aos diferentes manguezais amostrados, o grupo mais abundante foi Proteobacteria, que apresentou frequência de 65% em Bertioga com derramamento e 42% no manguezal de Bertioga sem derramamento. De maneira mais específica os grupos Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria (19% e 13% das sequências), e Gammaproteobacteria (46% e 29% das sequências) diferiram entre os manguezais estudados (Figura 4.8). No entanto, a maior diferença observada foi relacionada ao grupo de bactérias anaeróbicas redutoras de sulfato, que teve frequência de 16% no manguezal de Bertioga contaminado e 42% no manguezal sem derramamento. No *cluster* gerado com sequências ditas específicas para os manguezais, o número se manteve similar entre os manguezais, sendo 15% para Bertioga ambos os manguezais estudados.

Considerando a afiliação mais detalhada das sequências do gene *nif*H, pode-se observar que os manguezais amostrados apresentam representantes deste gene afiliados aos diferente gêneros descritos como fixadores na literatura, como *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Desulfovibrio*, entre outros. Devido à localização dos manguezais na interface entre o mar e o continente, nas amostras analisadas foram encontradas sequências similares àquelas obtidas de ambiente marinho (*Desulfovibrio*) como também sequências com similaridade às encontradas em solos (*Gluconacetobacter*, *Rhizobium*) (Figura 4.8).

Detalhando tal análise dentro de cada manguezal, temos que nos pontos amostrados no manguezal com óleo, os grupos se mantiveram menos constantes que nos pontos de Bertioga não contaminado, sendo que no ponto 1 do manguezal contaminado com óleo o número de sequências de Gammaproteobacteria (68% das sequências) foi maior que nos demais pontos; e no ponto 3, o grupo das Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria mostrou uma maior incidência de

sequências (38% das sequências) quando comparadas com os demais locais analisados.

Além da análise taxonômica das sequências, estas foram também separadas de acordo com diferentes níveis de similaridades. Utilizando um agrupamento a 80% de similaridade (*cut-off* 0,20) foi determinada a ocorrência de 70 UTOs dentre as sequências que compõem as bibliotecas analisadas. Dentro dos grupos encontrados, o *cluster* Mgv *nif*H apresentou o maior número de UTOs (26 UTOs), seguido pelas bactérias anaeróbicas redutoras de sulfato (24 UTOs), Proteobacteria (17 UTOs) e por último Firmicutes (3 UTOs) (Figura 4.8).

De maneira mais específica, no manguezal de Bertioga contaminado o número de UTOs dentro de cada classe foi de 4 UTOs e 51 sequências nas Alpha e Beta proteobacterias, 5 UTOs e 21 sequências em Gammaproteobacteria, 2 UTOs 9 sequências nos Firmicutes, 12 UTOs e 42 sequências nas redutoras de sulfato e anaeróbicas e 16 UTOs e 39 sequências no *Cluster* Mgv *nif*H*.* Com relação ao manguezal de Bertioga livre do derramamento de óleo os grupos apresentaram OTUs e sequências da seguinte maneira: Alpha e Beta proteobacterias (4 UTOs e 30 sequências), Gammaproteobacteria (9 UTOs e 94 sequências), Firmicutes (2 UTOs e 3 sequências), redutoras de sulfato e anaeróbicas (22 UTOs e 65 sequências) e as do *Cluster* Mgv *nif*H (19 UTOs e 33 sequências) (Figura 4.8).

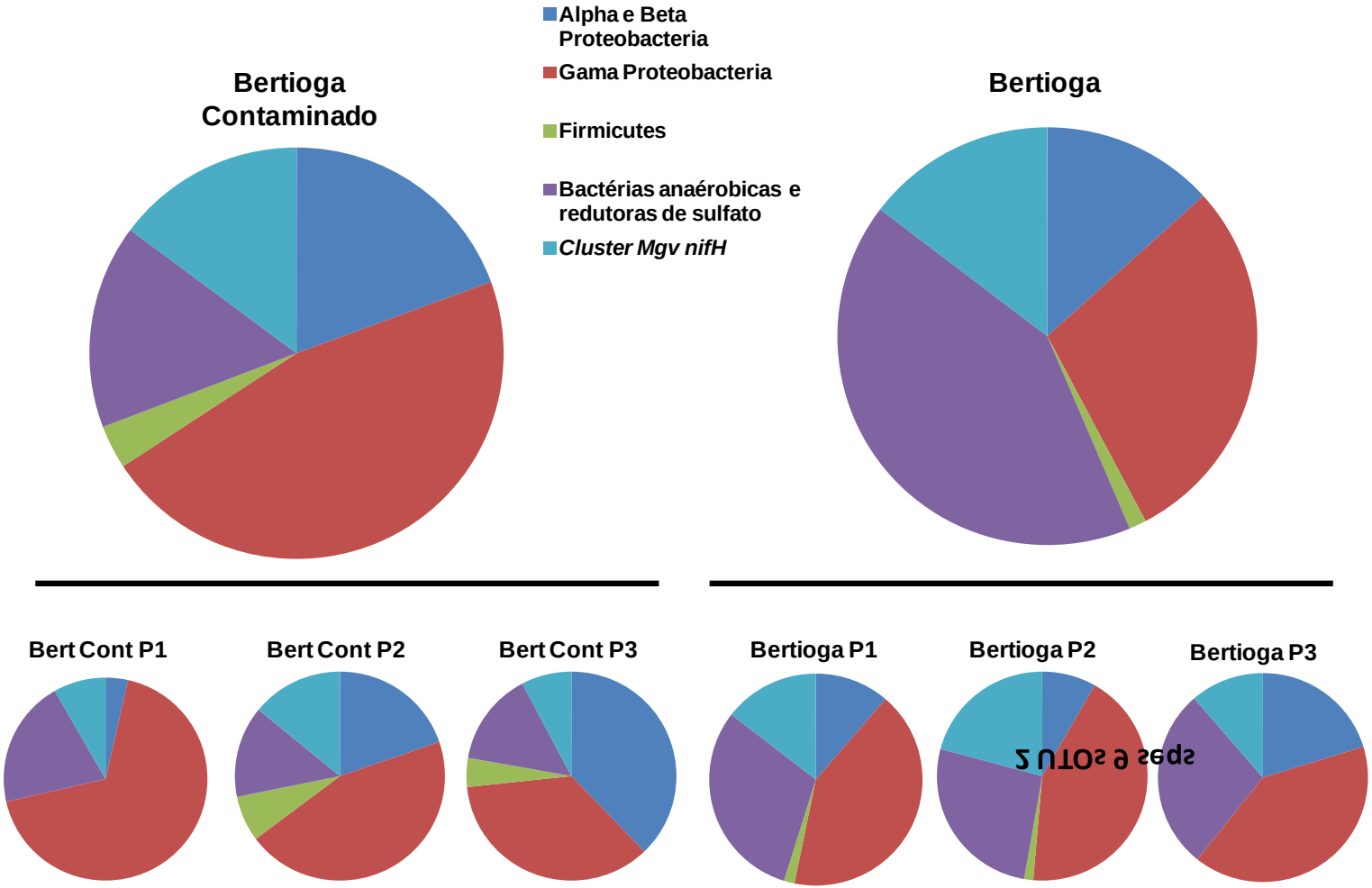


Figura 4.8 - Distribuição dos grupos taxonômicos do gene *nif*H em cada uma das bibliotecas analisadas. Adicionalmente, são demonstrados o número de UTOs e de sequências dentro de cada grupo em cada manguezal e dentro dos pontos amostrados

As bibliotecas foram também comparadas por meio da análise de UNIFRAC, que revelou que a composição da comunidade de fixadores de nitrogênio (*nif*H*)* analisadas nos seis diferentes pontos dos sedimentos de manguezais diferiram significativamente entre si. Isto foi confirmado por análise do agrupamento de *jack-knife* (Figura 4.9), onde ocorre a formação de dois clusters distintos, compostos por bibliotecas oriundas de Bertioga contaminado e outro derivado de sequências do manguezal de Bertioga não contaminado, confirmando os resultados obtidos pela análise de padrões de PCR-DGGE. Dento destes clusters maiores houve a segregação dos pontos analisados dentro que cada um dos manguezais estudados (Figura 4.9).

Figura 4.9 - Dendrograma baseado em bibliotecas de clones do gene *nif*H, mostrando as diferenças na estrutura da comunidade dos 6 pontos amostrados. As matrizes de distância geradas com UNIFRAC foram usadas para agrupar os pontos dos sedimentos analisados. Os métodos *unweightedpair,* método de grupo com média aritmética, e análise jack-knife foram usados para avaliar a robustez de cada cluster relacionado com o ambiente, tamanho e uniformidade da amostra. Os números indicam a frequência com que os nós foram apoiados por jack-knife análise

Considerando as análises de rarefação para os distintos pontos acessados dentro dos diferentes manguezais, pode-se observar que as curvas possuem pontos de inflexão distintos, o que indica diferenças na diversidade das comunidades encontradas em cada uma das áreas estudadas. Observa-se que existe uma maior tendência a estabilização das curvas para as amostras do manguezal com derramamento de óleo (principalmente pontos 2 e 3) (Figura 4.10), o que pode

indicar a seleção mais intensa nesta área, estreitando a diversidade do gene analisado e selecionando determinados grupos adaptados a esta condição ambiental.

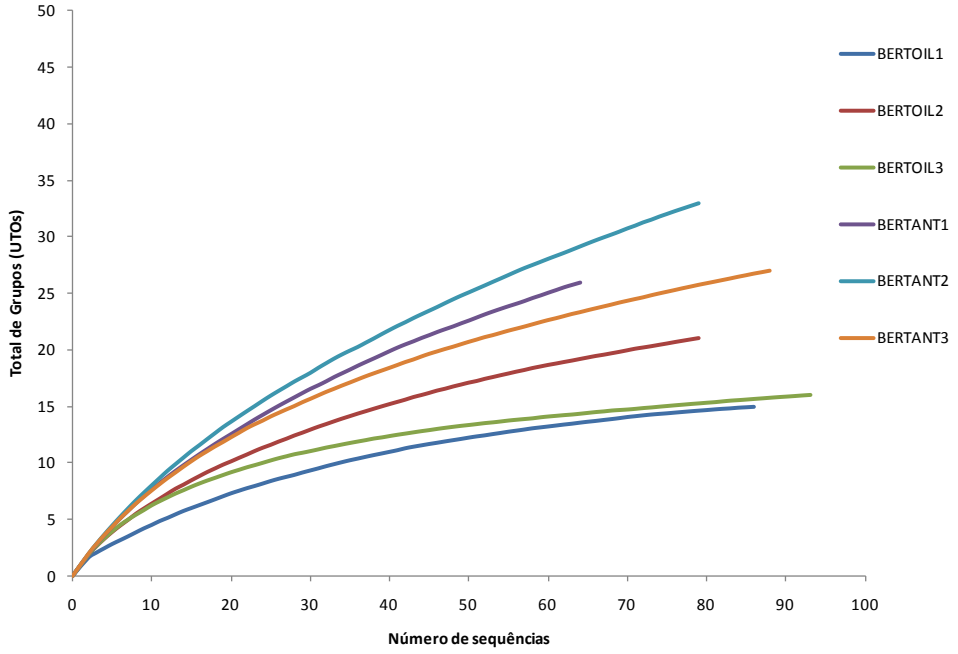


Figura 4.10 - Análise de rarefação das sequências obtidas, considerando 80% de similaridade para a formação dos grupos taxonômicos operacionais (UTOs)

4.4 DISCUSSÃO

As comunidades de bactérias presentes em manguezais têm grande importância na manutenção deste ecossistema, onde participam dos ciclos biogeoquímicos, fornecendo a base metabólica responsável pelo desenvolvimento das plantas e animais. Alguns estudos avaliaram a diversidade microbiana em manguezais, relatando os grupos existentes neste ambiente, e avaliando impactos ambientais sobre as comunidades residentes neste ecossistema (LIANG et al., 2007; GOMES et al., 2008; ZHOU et al., 2008; DIAS et al., 2010; ANDREOTE et al.,

2012[2]). Porém, comparado a outros ambientes, os estudos em manguezais são escassos na maioria das áreas onde estes ocorrem.

No presente capítulo, considerando os manguezais amostrados, contrastantes situações de conservação são encontradas, com destaque para o gradiente de contaminação que ocorre dentro de um dos manguezais estudados, o que nos permite cobrir a diversidade microbiana presente neste ambiente em situações de contaminação antrópica ou industrial. Os resultados encontrados devem, desta forma, se somar a prévios estudos, que avaliaram o efeito da contaminação antropogênica em manguezais (GOMES et al., 2008; SANTOS et al., 2011a). Porém, este capítulo adiciona a avaliação da diversidade intra-manguezais, amostrando e avaliando a diversidade em diferentes micro-ambientes, que ocorrem dentro de um mesmo manguezal. Dessa forma, o presente estudo busca contribuir com a descrição da diversidade e possível funcionalidade dos grupos de bactérias totais (16S DNAr) e fixadores de nitrogênio (*nif*H), encontrados nos sedimentos de distintos manguezais do Estado de São Paulo.

As funções microbianas nos ecossistemas são mediadas por enzimas funcionais, que são sintetizadas por determinados genes existentes em distintos organismos que compõe as comunidades microbianas ambientais (TORSVIK; ØVREAS, 2002). Como exemplo disso podemos citar a fixação biológica do N_2, promovida por diferentes grupos bacterianos, podendo ser influenciada tanto pela estrutura como pela atividade da comunidade microbiana residente, o que pode responder a perturbações antrópicas (POLY et al., 2001; ZEHR et al., 2003; TAKETANI et al., 2009). Devido à estratificação vertical das zonas aeróbias, anaeróbias e microaerofilia, manguezais são importantes ecossistemas para o estudo da atividade microbiana, onde processos podem evoluir de maneira diferencial, obedecendo às pressões de seleção particulares deste ecossistema (ANDREOTE et al., 2012). Dessa forma, temos que a fixação de N_2 por bactérias ainda não foi extensivamente avaliada neste ecossistema. Num trabalho em escala local, foi demonstrado que parâmetros ambientais e o tipo de vegetação podem influenciar a diversidade de comunidades fixadoras de nitrogênio (FLORES-MEIRELES et al., 2007). Este capítulo teve a proposta de avaliar tal gene, dentro do contexto da comunidade microbiana, encontrado em manguezais brasileiros,

avaliando tanto sua ocorrência, abundância e diversidade, como o efeito regulador das variáveis ambientais na estruturação de tal comunidade.

Em relação à diversidade microbiana encontrada nas amostras inicialmente avaliadas, os diferentes perfis de DGGE do gene *nif*H mostraram a composição destas comunidades e suas respostas às alterações ambientais. As alterações encontradas entre os manguezais amostrados corrobora com dados anteriores e publicados (TAKETANI et al., 2009), indicando que diferentes tipos de contaminação podem levar a alterações nas comunidades bacterianas presentes nos manguezais. Além disso, as análises de componentes principais mostram de maneira precisa a variação inter e intra-manguezais, que nos permitiu também observar que a porção da comunidade relacionada à fixação de nitrogênio é responsiva a tais fatores, possivelmente dando suporte a estudos futuros de bioindicadores de contaminação de manguezais. Em relação à congruência das separações observadas nos diferentes perfis de DGGE de bactérias totais e fixadoras de nitrogênio, temos que estes se mostraram altamente correlacionados de acordo com o teste de Mantel, indicando a separação entre os dois manguezais estudados, e destacando a estruturação diferencial das comunidades encontradas nas áreas de maior contaminação dentro de um mesmo manguezal. Estas observações permitem inferir sobre a essencialidade da fixação biológica do nitrogênio em tal ambiente, uma vez que uma alteração nas condições ambientais remete diretamente a uma reorganização de tal comunidade, sendo esta congruente em diferentes amostras e pontos analisados.

Os dados de sequenciamento em larga escala (pirosequenciamento) dos manguezais evidenciaram a dominância do filo Proteobacteria, corroborando com vários estudos que mostram que tais organismos são importantes na dinâmica da microbiota de diversos solos (WILL et al., 2010; NACKE et al., 2011). Dentro de tal grupo foi observada uma grande ocorrência de sequências afiliadas a classe Deltaproteobacteria, o que havia sido reportado anteriormente na literatura (DIAS et al., 2010). Uma possível explicação para esta incidência do grupo das Deltaproteobacteria é a frequente inundação pelo mar nestas áreas, o que pode aumentar a ocorrência de anaerobiose em tais sedimentos, favorecendo o grupo de bactérias anaeróbicas. Tais organismos mostraram-se os mais abundantes em estudos de sedimentos de manguezais, onde a condição de anaerobiose é predominante, sendo tais organismos responsáveis por importantes passos na

ciclagem de carbono, nitrogênio e enxofre (SANTOS et al., 2011b; ANDREOTE et al., 2012). Este filo está presente em comunidades microbianas do solo, água doce e marinha (PEREIRA et al., 2011; BURNS et al., 2002; LOVELL; DAVIS, 2012). A ordem Desulfobacterales, pertencente a este filo, ocorreu de forma abundante nas amostras de sedimentos de manguezais contaminados por óleo (SANTOS et al., 2011b), sendo que organismos pertencentes a esta ordem são caracterizados como redutores de sulfato em sedimentos (LYIMO et al., 2009; TAKETANI et al., 2010).

Outro grupo de grande abundância foi o filo Bacterioidetes, com 10,21% das sequências. Este filo está presente em comunidades microbianas do solo, água doce e marinha; e também encontrados em ambientes de transição continente-mar como manguezais tropicais (CASTINE et al., 2009; DIAS et al., 2010). Sendo assim, estes resultados mostram que, apesar de todas as áreas estudadas fazerem parte do mesmo ecossistema, a diversidade microbiana do sedimento pode variar biogeograficamente, levando a crer que este cenário está apenas começando a revelar o reservatório inexplorado da biodiversidade bacteriana e genes funcionais presentes nos manguezais.

A amonificação bacteriana, nitrificação, desnitrificação, redução dissimilatória de nitrato de amônio (DNRA) e oxidação anaeróbica de amônio são as principais transformações de ciclo do nitrogênio (BURGIN; HAMILTON, 2007). De fato, o equilíbrio entre essas vias é altamente influenciado pelas condições ambientais, como temperatura, disponibilidade de oxigênio, nitrato e teor de matéria orgânica no sedimento (SAUNDERS; KALFF, 2001). O presente capítulo mostra a ocorrência e a resposta de um gene relacionado a uma destas transformações, a fixação do nitrogênio atmosférico, corroborando com os dados da literatura, onde o papel de bactérias diazotróficas é enfatizado e importante em sedimentos de manguezais (FLORES-MIRELES et al., 2007). Destaca-se, portanto, a necessidade e a importância de se estudar outros genes relacionados a transformação do nitrogênio neste ambiente pouco explorado, e com características únicas.

A quantificação e o estudo de diversidade das comunidades fixadoras de nitrogênio, com o sequenciamento de clones, permitiram a afiliação taxonômica das sequências obtidas, suprindo informações sobre a filogenia de grupos microbianos fixadores de nitrogênio residentes nos manguezais avaliados. Podemos atribuir à presença dos grupos encontrados a sua capacidade de adaptação ao ambiente variável em condições de salinidade e anaerobiose encontradas em manguezais

(KATHIRESAN et al., 2001; HOLGUIN et al., 2006). Considerando a filogenia das sequências do gene *nif*H, pode-se observar que os manguezais apresentam representantes deste gene afiliados aos diferente filos descritos para sua filogenia. Além destes grupos, várias sequências se agruparam de forma distinta das encontradas nos bancos de dados, o que nos leva a hipótese que domínios diferentes do gene *nif*H podem ocorrer nos manguezais, possivelmente indicando neste ambiente a geração de uma diversidade não encontrada em outro ecossistema. É importante destacar que este tipo de observação é presente na literatura, como no caso do estudo do gene *dsr*B, envolvido na ciclagem de enxofre nos manguezais (TAKETANI et al., 2010); no estudo do gene *amo*A de Archaea (capítulo anterior); e vem sendo relatado por outros grupos que trabalham coma s amostras usadas neste estudo, por exemplo o gene *pmoA*, relacionado a metanotrofia, estudado pela aluna Débora Linhares, orientada pela Dra. Vivian Pellizari, do IO/USP.

Os resultados relatados neste capítulo rendem uma percepção ampla e inovadora sobre a diversidade de bactérias totais e fixadoras de nitrogênio em sedimentos de manguezais, e ainda revela a possível ocorrência de novos grupos bacterianos neste ambiente.

4.5 CONCLUSÕES

Este capítulo acessou a diversidade de bactérias existente em solos de dois manguezais com diferentes níveis de perturbação no Estado de São Paulo, e gerou informações que permitem concluir que:

- as estruturas das comunidades de bactérias, bem como o grupo de bactérias relacionadas à fixação biológica do nitrogênio, respondem a contaminação por petróleo com alterações qualitativas e quantitativas;
- a filogenia de bactérias mostrou uma grande quantidade de sequências não classificadas dentro dos filos conhecidos;
- dentre os filos conhecidos, a grande abundância foi de Proteobacteria, com destaque para a alta frequência da classe Deltaproteobacteria;

- a filogenia do gene *nif*H indicou a ocorrência de grupos relacionadas com aqueles já conhecidos, além de revelar grupos de sequências únicas encontradas neste ambiente;

Com base em tais conclusões, tem-se como principal mensagem deste capítulo um grande acesso a diversidade microbiana em tal sistema, demonstrando que as duas frações da comunidade responde de maneira similar a contaminação por petróleo.

Analisando esta tese como um todo, temos como principal '*take home message*', a descrição da diversidade de bactérias e arquéias presentes em sedimentos de manguezais; a importância da preservação do manguezal na manutenção de tal diversidade; e a possibilidade da ocorrência de grupos exclusivamente encontrados em tal ambiente, o que pode ampliar nosso conhecimento da diversidade filogenética e funcional microbiana.

REFERÊNCIAS

ANDREOTE, F.D., JIMENEZ, D.J., CHAVES, D., DIAS, A.C.F., LUVIZOTTO, D.M., DINI-ANDREOTE, F., FASANELLA, C.C., BAENA, S., LOPEZ, M.V., TAKETANI, R.G., MELO, I.S. THE MICROBIOME OF BRAZILIAN MANGROVE SEDIMENTS AS REVEALED BY METAGENOMICS. **PLOS ONE**, V. 7, P. E38600, 2012.

BURGIN, A. J.; HAMILTON, S. K. Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways. **Frontiers in Ecology and the Environment**, Washington, DC, v. 5, p. 89–96, 2007.

BURNS, J. A.; ZEHR, J. P.; CAPONE, D. G. Nitrogen-fixing phylotypes of Chesapeake Bay and Neuse River Estuary sediments. **Microbial Ecology**, New York, v. 44, p. 336–343, 2002.

DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D.; RIGONATO, J.; FIORE, M. F.; MELO, I. S.; ARAÚJO. W. L. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 98, p. 541–551, 2010.

DUKE, N. C.; MEYNECKE, J. O.; DITTMANN, S. A world without mangroves? **Science**, Washington, DC, v. 317, p. 41–42, 2007.

CASTINE, S. A.; BOURNE, D. G.; TROTT, L. A.; MCKINNON, D. A. Sediment microbial community analysis: establishing impacts of aquaculture on a tropical mangrove ecosystem. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 297, p. 91–98, 2009.

CLEARY, D. F. R.; SMALLA, K.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; GOMES, N. C. M. Assessment of Variation in Bacterial Composition among Microhabitats in a Mangrove Environment Using DGGE Fingerprints and Barcoded Pyrosequencing. **PLoS ONE,** San Francisco, v. 7, n. 1, e29380, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0029380.

FLORES-MIRELES, A. L.; WINANS, S. C.; HOLGUIN, G. Molecular characterization of diazotrophic and denitrifying bacteria associated with mangrove roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 73, p. 7308-7321, 2007.

GOMES, N. C. M.; BORGES, L. R.; PARANHOS, R.; PINTO, F. N.; MENDONÇA-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.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HOLGUIN, G.; ZAMORANO, P. G.; BASHAN, L. E. D.; MENDOZA, R.; AMADOR, E.; BASHAN, Y. Mangrove health in an arid environment encroached by urban development — a case study. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 363, p. 260–274, 2006.

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**, Berlin, v. 33, p. 265-278, 2001.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, London, v. 40, p. 81–251, 2001.

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**, Berlin, v. 150, p. 739–747, 2007.

LOVELL, C. R.; DAVIS, D. A. Specificity of saltmarsh diazotrophs for vegetation zones and plant hosts: results from a North American marsh. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v.3, article 84, 2012.

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

NACKE, H.; THÜRMER, A.; WOLLHHERR, A.; HODAC, L.; HEROLD, N.; SCHONING, I.; SCHRUMPF, M.; DANIEL, R. Pyrosequencing-based assessment of

bacterial community structure along different management types in german forest and grassland soils. **PloS ONE**, San Francisco, v. 6, e17000, 2011.

PEREIRA, S. M. C.; SEMENOV, A.; VAN ELSAS, J. D.; SALLES, J. F. Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 77, p. 1–12, 2011.

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

SANTOS, H. F.; CARMO, F. L.; PAES, J. E.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. **Water, Air & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 216, p. 329–350, 2011a.

SANTOS, H. F.; CURY, J. C.; CARMO, F. L.; SANTOS, A. L.; TIEDJE, J.; VAN ELSAS, J. D.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. **PLOs ONE**, San Francisco, v. 6, e16943, 2011b.

SAUNDERS, D. L.; KALFF, J. Nitrogen retention in wetlands, lakes and rivers. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 443, p. 205–212, 2011.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community- supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

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

TAKETANI, R. G.; DOS SANTOS, H. F.; VAN ELSAS, J. D.; ROSADO, A. S. Characterization of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 96, p. 343–354, 2009.

TAKETANI, R. G.; FRANCO, N. O.; ROSADO, A. S.; VAN ELSAS, J. D. Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. **Journal of Microbiology**, Seoul, Korea, v. 48, p. 7–15, 2010.

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

ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 5, p. 539–554, 2003.

ZHOU, H. W.; LUANC, T. G.; ZOUB, F.; TAM, N. F. Y. Different bacterial groups for biodegradation of three- and four-ring PAHs isolated from a Hong Kong mangrove sediment. **Journal of Hazard Materials**, Amsterdam, v. 152, p. 1179–1185, 2008.

WILL, C.; THURMER, A.; WOLLHERR, A.; NACKE, H.; HEROL, N.; SCHRUMPF, M.; GUTKNECHT, J.; WUBET, T.; BUSCOT, F.; DANIEL, R. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 76, p. 6751-5759, 2010.

ANEXO

Anexo A – Artigo publicado no Journal of Soils and Sediments.

Anexo B – Artigo publicado na Applied Environmental Microbiology.

J Soils Sediments (2011) 11:1466–1476
DOI 10.1007/s11368-011-0423-7

SEDIMENTS, SEC 4 • SEDIMENT-ECOLOGY INTERACTIONS • RESEARCH ARTICLE

Archaeal communities in the sediments of three contrasting mangroves

Armando Cavalcante Franco Dias · Francisco Dini-Andreote · Rodrigo Gouvêa Taketani · Siu Mui Tsai · João Lúcio Azevedo · Itamar Soares de Melo · Fernando Dini Andreote

Received: 31 January 2011 / Accepted: 26 August 2011 / Published online: 14 September 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract
Purpose This study evaluates the presence and diversity of 16S rRNA (*rrs*) and *amoA* genes from archaea in three mangrove sediments under different stages of preservation (one pristine mangrove, one affected by anthropogenic activity, and another contaminated by an oil spill) in the state of São Paulo (Brazil).
Materials and methods A combination of DGGE, coupled with ordination analysis, and clone libraries of both targeted genes (*rrs* and *amoA*) was used to infer the diversity and phylogeny of archaeal communities in the mangrove analyzed samples.
Results and discussion The DGGE combined with multivariate analysis revealed, based on the ribosomal gene, differences in archaeal communities according to environmental parameters such as mangrove location, anthropogenic activity, and oil contamination. The profiles based on the *amoA* gene were more similar than those obtained for the gene *rrs*, with the only difference statistically observed for the community found in the mangrove under anthropogenic pressure. Furthermore, phylogenetic analysis revealed most archaeal groups affiliated to sequences belonging to the Thaumarchaeota (53.1%, 24 OTUs) and Euryarchaeota (29.6%, 14 OTUs) phyla, in addition to 14 sequences affiliated to an unclassified Archaea (16.1%, 8 OTUs). Concerning the analysis of the *amoA* gene, mangroves harbored sequences affiliated with those previously described in water column and soil/sediment samples, besides two possible clusters specifically found in mangroves.
Conclusions The findings are that the mangroves act as a reservoir for archaeal diversity, are possibly involved in nitrogen transformation in this ecosystem, and are affected by distinct pressures caused by anthropogenic activities.

Keywords 16S rRNA · Ammonium processing · *amoA* · Euryarchaeota · Thaumarchaeota

Responsible editor: Geraldene Wharton

A. C. F. Dias · F. Dini-Andreote · I. S. de Melo
Laboratory of Environmental Microbiology,
CNPMA — Embrapa Environment,
Jaguariúna, Brazil

F. Dini-Andreote
Department of Genetics, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), University of São Paulo,
Piracicaba, Brazil

A. C. F. Dias · R. G. Taketani · S. M. Tsai · J. L. Azevedo
Center for Nuclear Energy in Agriculture, CENA/USP,
University of São Paulo,
Piracicaba, Brazil

F. D. Andreote (✉)
Department of Soil Science, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), University of São Paulo,
Piracicaba, Brazil
e-mail: fdandreo@gmail.com

1 Introduction

Mangroves are ecosystems typically found in tropical and subtropical regions. They are located at the interface between terrestrial and marine environments and are subject to periodic flooding by high tides (Holguin et al. 2001). Mangrove sediments differ from common soils mainly due to their low availability of oxygen, salinity, and highly reductive redox potential, which makes organic matter hard to degrade, thus limiting the availability of nutrients on the basis of the trophic web (Holguin et al. 2001; Ferreira et al. 2010). However, the frequent shifts in environmental conditions, due to tidal regimes, maintain mangroves as

hotspots for microbial diversity. The activities of these microorganisms are therefore essential to the function and maintenance of the mangrove system, harnessing the biogeochemical cycles and supplying plants and animals with primary nutritional sources (Kathiresan and Bingham 2001).

Studies of microbial life in mangroves have assessed bacterial communities in well-preserved mangroves (Dias et al. 2010), urban mangroves (Gomes et al. 2008), mangroves affected by shrimp farms (Sousa et al. 2006) and contaminated with hydrocarbons (Taketani et al. 2010a). However, most of these studies focused on bacterial communities, neglecting the diversity of archaea in such environments.

The domain Archaea was described as one of the three major evolutionary lineages of life on Earth (Woese et al. 1990), but it is not yet studied to the same extent as the other living organisms (i.e., the domains eukarya and bacteria). However, due to the recognition of mangroves as hotspots for microbial communities, such environments now present a justification for the characterization of archaeal diversity. Studies targeting these communities are of great value, as these organisms have an important role in marine and other closely related environments (Fuhrman et al. 1992; Karner et al. 2001). Information about archaeal communities and their importance in mangroves is still scarce, although one valuable study on a Chinese mangrove has already described such communities as being primarily composed of Crenarchaeota and Euryarchaeota phyla (Yan et al. 2006). Concerning the functions of archaea in biogeochemical cycles, members of the phylum Euryarchaeota have been described as being active in carbon transformations through methanogenesis, which occurs in anaerobic conditions, frequently found in mangroves sediments (Lyimo et al. 2009; Taketani et al. 2010b). However, the role of archaea in other nutrient cycles, such as nitrogen, has not been extensively assessed in mangroves. Recent findings show archaea participating in an important part of nitrogen cycling, as key organisms involved in the ammonium oxidation throughout a range of environments (Treusch et al. 2005; Nicol and Schleper 2006; Francis et al. 2007; and for a review, see Erguder et al. 2009). Only one study has examined this issue specifically in mangroves; Li et al. (2010) found a controversial behaviour of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea, with a higher abundance of bacterial partners in these areas. These authors state that, although the mangrove sediments are predominantly anoxic, the constant shifting in aerobic and anaerobic conditions caused by tidal regime provides the occurrence of suitable environments for the nitrification process, possibly supplying the nitrate to be processed in other nitrogen transformations such as denitrification and anammox.

Considering mangroves as an ecosystem with a unique combination of environmental conditions, including the frequent aerobiosis–anaerobiosis interface caused by the tidal regime, the soil salinity, and the biochemically reductive characteristic (negative values of redox potential), this ecosystem becomes an interesting location in which to study the diversity of archaea. The aim of the present study was to examine, by culture-independent analyses (DGGE and clone libraries), the diversity of phylogenetic and ammonia-oxidizing archaeal communities in three distinct mangroves, which are different in their state of preservation, level of contamination, and geographical location.

2 Material and methods

2.1 Mangrove locations

Three distinct mangroves located on the coast of the São Paulo state (Brazil) were sampled: two close to the city of Bertioga and one located in the city of Cananéia, on a nondisturbed island called Ilha do Cardoso (Fig. 1). The sampling was undertaken in July 2008 (average temperature 18°C), with expeditions during the low tides. These mangroves differ in their states of conservation and contamination; the mangroves from Bertioga have been affected by either oil (Oil Mgv; 23°53′49″S, 46°12′28″W) or anthropological contaminants (Ant Mgv; 23°54′06″S, 45°15′03″W), and the mangrove from Cananéia (Prs Mgv; 25°05′02″S, 47°57′42″W) was still in a pristine condition (in this study considered as an external and pristine environment control). The Oil Mgv has a history of contamination, with the most recent spill in 1983, when 35 million liters of oil spilled into the mangrove area. In this mangrove, the native vegetation is still undergoing recovery. The Ant Mgv is near to the urban area of Bertioga, which has suffered from the effects of sludge and other urban waste deposits to the sea near the area. These three mangroves also differ in flood cycles. While the mangroves in Bertioga receive mixed water from the sea and Iriri River, the mangrove in Cananéia is located in an estuary mostly under tidal influence by the Atlantic Ocean.

2.2 Sample characteristics

At each mangrove, sediment samples were collected along a transect from the sea to the land, delimiting three subregions characterized by their proximity to the sea (Point 1), the middle of the mangrove (Point 2), and the proximity to the land (Point 3; see Fig. 1). In each of these three subregions, samples were collected in triplicate, subjected to freezing by direct immersion in liquid nitrogen and stored at −80°C for further analysis. Each sample

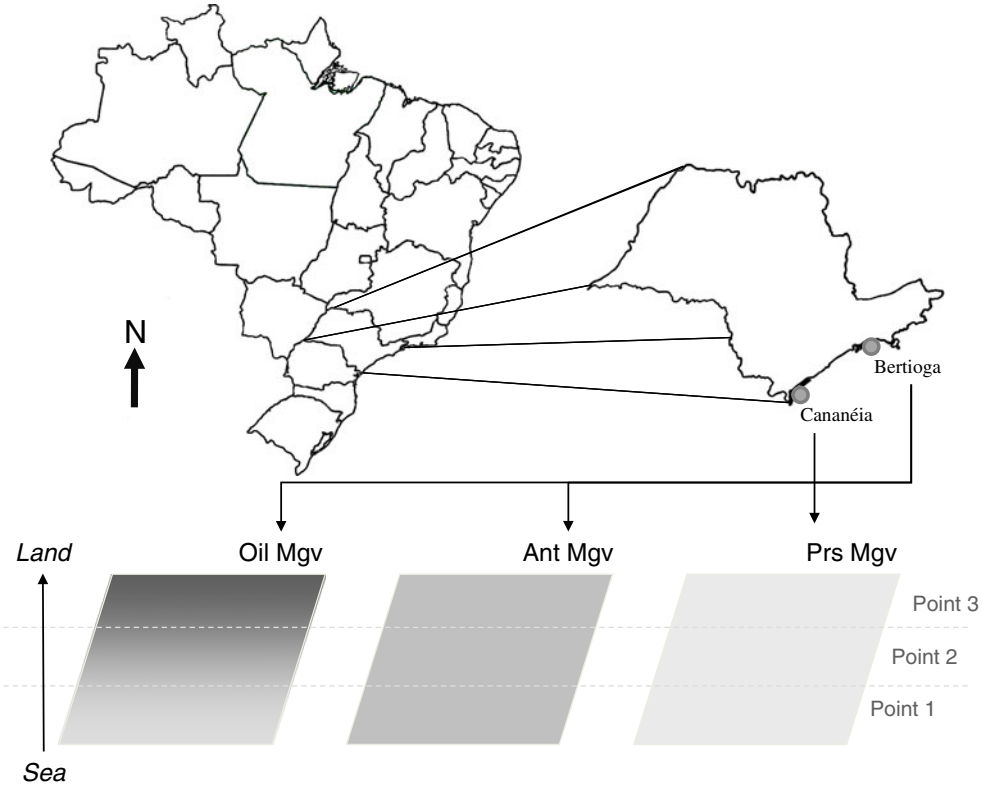


Fig. 1 Location of the three sampled mangroves in Brazil. Two mangroves are located in the city of Bertioga (Oil Mgv and Ant Mgv), and one is in the city of Cananéia, on an undisturbed island named Ilha do Cardoso (Prs Mgv)

consisted of a sediment core collected via a cylindrical steel sampler (7-cm diameter×30-cm depth). In total, 27 samples were taken: three mangroves×three subregions×three replicates. At the moment of sampling, electrical conductivity and salinity parameters were also recorded. In addition, the sand: silt:clay content and chemical composition of the sediments were determined for the nine sampling points. These analyses were carried out in collaboration with the Laboratory of Soil Analysis at Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP, Piracicaba, Brazil), according to the methodology described by Van Raij et al. (2001; Table 1).

In the case of the Oil Mgv site, it should be noted that Points 2 and 3 (in the middle and closer to the land, respectively) showed greater effects of oil contamination, based on

Table 1 Physical and chemical characteristics of sediment samples collected from three points in three different mangrove systems. Sampling points were along transects according to their proximity to the sea (Point 1), the middle of the mangrove (Point 2) and proximity to the land (Point 3)

	Mangroves								
	Oil Mgv			Ant Mgv			Prs Mgv		
Physical parameters	Point 1	Point 2	Point 3	Point 1	Point 2	Point 3	Point 1	Point 2	Point 3
Sand:silt:clay	34:60:6	69:26:5	35:50:15	71:24:05	59:36:05	57:38:05	22:26:52	82:6:12	78:12:10
Chemical parameters									
pH	6.90	6.80	6.40	7.10	6.80	6.90	5.90	6.40	6.30
Humidity (%)	65.16	69.66	48.26	73.97	78.39	75.82	69.90	40.79	49.18
Organic matter (%)	10.86	12.89	10.89	10.28	9.89	11.43	7.54	5.43	6.35
Total carbon (%)	6.03	7.16	6.05	5.71	5.50	6.35	13.92	5.10	6.95
Organic carbon (%)	5.33	5.60	5.15	4.77	4.62	5.19	12.23	3.04	3.53
Total nitrogen (%)	0.13	0.45	0.31	0.29	0.26	0.34	0.72	0.21	0.23
Total sulphur (%)	0.31	0.36	0.32	0.24	0.26	0.20	0.23	0.14	0.14
Conducivity (mS)	7.77	8.01	8.84	5.56	8.22	8.36	20.81	11.42	3.54
Salinity (%)	0.47	0.46	0.48	0.30	0.46	0.46	1.26	0.68	0.17

observations of the vegetation state and occurrence of crabs in the area. Point 1, from the same mangrove, was less contaminated, with similar characteristics to the Ant Mgv. The distinction between the subregions in Oil Mgv is heightened by a small river that crosses the mangrove, effectively sectioning off and limiting oil drainage to Point 1.

2.3 DNA extraction from sediment samples

Each of the sediment samples was subjected to DNA extraction using the *Power Soil DNA Isolation kit* (MoBio, USA), with an initial sediment quantity of 0.3 g, and resulting in an average of 30 ng μl^{-1} of DNA per sample. An accurate quantification of the extracted DNA was performed using NanoDrop (Thermo Scientific, USA).

2.4 Analysis of the archaeal communities in mangrove sediments by DGGE and ordination analysis

Archaeal amplicons of *rrs* genes were obtained as described by Øvreas et al. (1997), with primers Arch21F (5′-TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA-3') and Arch958R (5′-YCC GGC GTT GAM TCC AAT T-3′) in the first reaction and the nested amplification with primers Arch340FGC (5′-GC clamp-CTA CGG GGY GCA SCA G-3') and Arch519R (5′-TTA CCG CGG CKG CTG-3′). The *amoA* genes were amplified as described by Sahan and Muyzer (2008), with primers amoA-23 F (5′-ATG GTC TGG CTW AGA CG-3′) and amoA-616R (5′-GCC ATC CAT CTG TAT GTC CA-3′). The only modification was the amplification of *amoA* gene by nested PCR (both with the same primers, except for the GC clamp used in the forward primer in the second reaction) due to the low abundance of this gene in most of the analyzed samples. Results of PCR were always checked in agarose gels to determine amplicon size and specificity prior to DGGE analysis.

DGGE analysis was conducted as described previously (Muyzer et al. 1993) using the Ingeny phorU2 apparatus (Ingeny International, Goes, The Netherlands). PCR products were loaded into 8% (*rrs*) and 6% (*amoA*; w/v) polyacrylamide gels, respectively, in 0.5×TAE buffer (20 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0). The polyacrylamide gels were made with denaturing gradients with ranges from 30% to 55% for *rrs* and from 15% to 55% for (where the 100% denaturant contained 7 M urea and 40% formamide). The gels were run at 100 V for 16 h at 60°C and were subsequently soaked for 1 h in SYBR Gold nucleic acid staining solution (Invitrogen, Brazil) before being immediately photographed under UV light. In total, 27 samples were subjected to a denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis (three points×three replicates×three mangroves). Such an approach allowed a one DGGE-gel analysis for comparative samples, thus avoiding the gel-to-gel variation bias. DGGE fingerprints were obtained for the *Archaea* domain and for a specific group of ammonia-oxidizing archaea, represented by the *amoA* gene profiles.

DGGE patterns were normalized and compared using GelComparII software (Applied Maths, Sint Martens Latem, Belgium). The bands were identified, and a matrix containing the relative area of each band in each sample was generated and used for the detrended correlation analysis (DCA), revealing the linear distribution of data (for a review, see Andreote et al. 2009). Then the first glance on the clustering of samples was made by principal component analysis (PCA), using as input the matrices of band intensities in each of the analyzed samples. In addition, ordination analysis was run to rank properly the distinct environmental parameters influencing the composition of archaeal communities in mangrove sediments. The band matrices were then correlated to the environmental variables, encompassing nominal variables (mangrove location, point of sampling, and oil contamination) and quantified parameters (electric conductivity and salinity values). The redundancy model (RDA) was applied, with a significance test performed by the nonparametric Monte Carlo permutation test (with 499 random permutations). The output of RDA also supplied information about the marginal effects of the environmental variables, quantifying the amount of variance explained by each factor (Lambda 1). All these analyses were carried out using Canoco (Canoco 4.5, Biometris, Wageningen, The Netherlands).

2.5 Construction and analysis of clone libraries for the targeted genes

For *rrs* and *amoA* clone library construction, PCR amplifications from all 27 samples were pooled based on the previous profile obtained by DGGE, generating one library for each target gene. The *rrs* amplicons were generated using primers Arch21F and Arch958R (937 bp; Øvreas et al. 1997) and archaeal *amoA* amplicons were obtained as described by Francis et al. (2005), with primers arch-amoAF (5′-STA ATG GTC TGG CTT AGA CG-3′) and arc-amoAR (5′-GCG GCCA TCC ATC TGT ATG T-3′; 635 bp). In this study, such an approach was used only to infer major archaeal groups commonly found in the mangroves, and not to perform comparisons among mangroves sample points.

PCR products from each sample (27 in total) were mixed (20 μl), and the pool was purified and cloned into the pGEM-T Easy cloning vector (Promega, Madison, WI, USA) and introduced into *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the protocol provided by the manufacturer. Plasmids containing the cloned genes were extracted by an alkaline lysis method,

and DNA sequencing was performed using plasmid DNA, the SP6 primer, and a DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) according to manufacturer's specifications. The purified reaction was then resuspended in HiDi formamide (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the samples were read in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.6 16S rRNA (*rrs*) and *amoA* sequence trimming and analysis

Chromatograms were trimmed and selected for high quality sequences at the Ribosomal Data Project Pipeline. Only sequences longer than 400 basis and with more than 80% of the basis presenting quality score higher than 20 at Phred/Phrap software were selected to constitute the final data sets. In total, 81 and 62 sequences of *rrs* and *amoA* genes, respectively, met these parameters and were used for further analysis. The matrix of pairwise sequence similarities was calculated with DNADIST (http://cmgm.stanford.edu/phylip/dnadist.html) using the Kimura-2 parameter. Sequences were further assigned to operational taxonomic units (OTUs) using DOTUR (Schloss and Handelsman 2005). Rarefaction analysis was performed to determine the OTU richness of distinct archaeal groups and *amoA* genes at a cutoff value of 97%. For *amoA* analysis, lower cutoff values (85%, 90%, and 95% of similarity) were also considered. Rarefaction diagrams were constructed by plotting the number of OTUs as a function of the number of individual clones sampled. The DOTUR also generated richness indices (ACE and *Cha*oI values) for the libraries.

For an accurate phylogenetic analysis, one sequence from each OTU, at a cutoff value of 97%, was compared for similarity to sequences from the Ribosomal Database Project II (*rrs*) and the GenBank (*amoA* gene) database. The best matched sequences for each OTU-representing clone were retrieved from the databases and used for phylogenetic analysis. The phylogeny was reconstructed using Mega 4.0 software, the kimura-2 parameter, and a neighbor-joining clustering methodology. More details about the phylogenetic analyses are provided in the captions of Figs. 4 and 5.

3 Results

3.1 Distinctions of mangroves based on environmental data

Concerning the physical–chemical parameters of the sediment samples collected from these mangroves, some specific characteristics can be pointed out (see Table 1). First, the only physical difference was observed in the mangrove on Cardoso Island (Prs Mgv), where a higher content of clay was observed at sampling Point 1. This area also had higher values for total carbon, organic carbon, and total nitrogen (see Table 1). There was little variation in pH. The amount of organic matter was lower at the three Prs Mgv sampling points. There were large differences in salinity and consequently for the electrical conductivity, which were higher at Points 1 and 2 of the mangrove located on Cardoso Island (Prs Mgv), where values reached 20.81 and 11.42 mS, respectively (see Table 1).

3.2 Differential composition of the archaeal communities in analyzed mangroves

The DGGE patterns obtained with amplicons of the ribosomal gene were composed by a high number of bands with similar profile for all samples. However, shifts in band intensities among distinct mangroves, and within each mangrove sampling point, were observed (see Fig. 2a). PCA separated in the first axis the samples from Points 1 and 2 of the Prs Mgv from the other locations (see Fig. 2b), which, as described above, had higher values of salinity and electrical conductivity (see Table 1). In the second axis, the separation occurred between the two mangroves located in Bertioga (see Fig. 2b). An ordination of these effects over the archaeal communities correlates the DGGE patterns with the environmental variables intrinsic to each sample (mangrove location, point of sampling, electric conductivity, salinity values, and oil contamination; Table 2). The DCA indicated a linear distribution of the data, with a gradient length for the first axis of 1.8, indicating that the RDA was the proper mathematical model for multivariate analysis. Such analyses have confirmed the observations from PCA and ranked the major differences caused by distinct mangroves, including significant changes caused by salinity and oil contamination variables ($p<0.05$; Table 2).

In a similar analysis of the *amoA* gene, DGGE patterns indicate a similar composition of ammonia-oxidizing archaeal communities in the samples (see Fig. 2c). Consequently, the *amoA*-based PCA did not result in a clear separation of samples from distinct mangroves, contradicting the previous observations made for the 16S rRNA-based analysis (see Fig. 2d). However, the RDA performed due to the gradient value of 1.4 was more sensitive and revealed the significant role of Ant Mgv in the composition of archaeal *amoA* diversity.

3.3 Phylogeny of targeted archaeal genes in mangroves

Due to the small variation on DGGE patterns, only one library was made for each gene in order to supply an

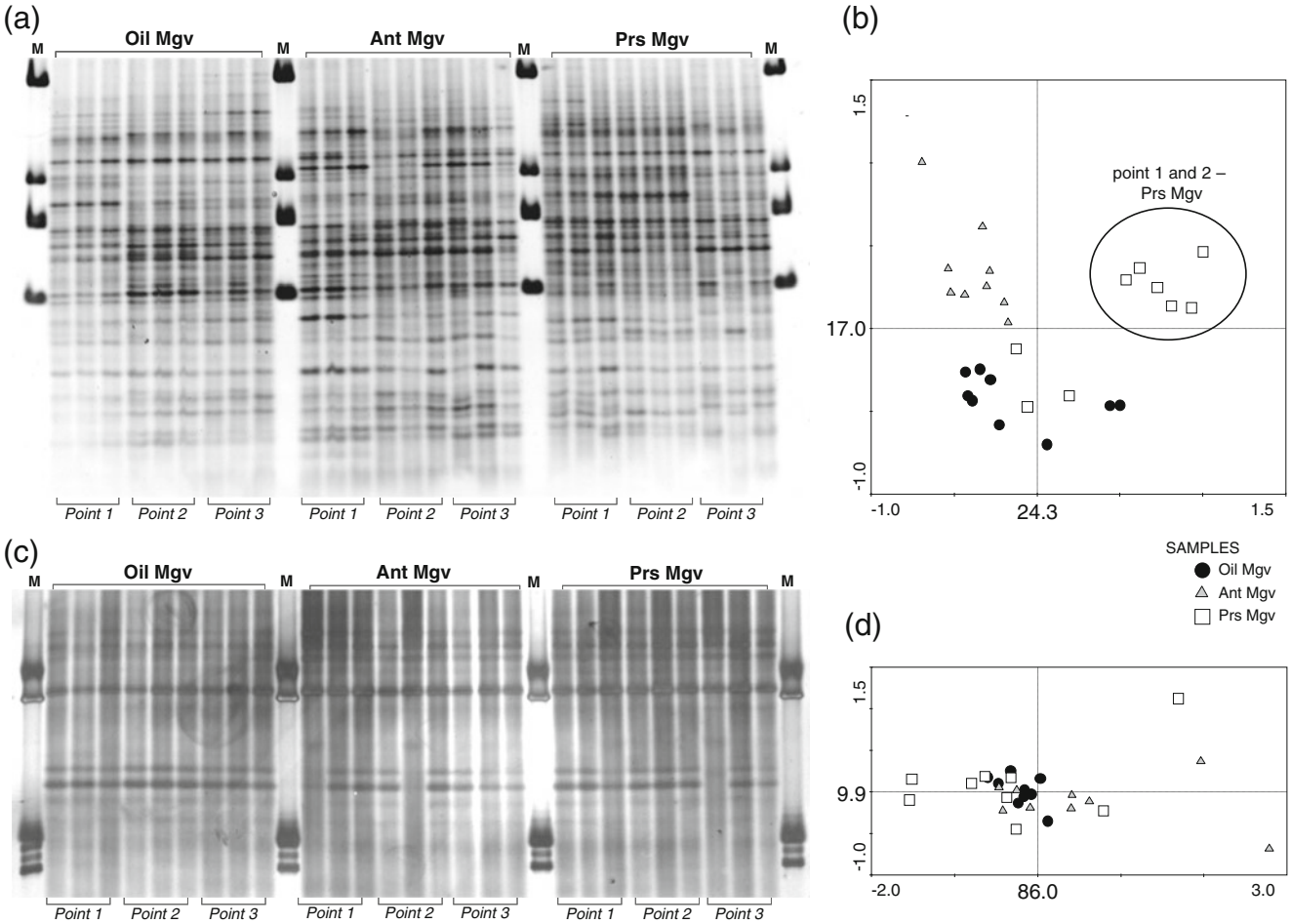


Fig. 2 Composition of the archaeal communities in mangrove sediments by DGGE based on the *rrs* (**a**) and *amoA* (**c**) genes. In gels, *M* indicates marker lanes, and samples from distinct mangroves are named accordingly. The clustering was made by PCA from DGGE patterns of the *rrs* (**b**) and *amoA* (**d**) genes. Values on the *axes* indicate the variance explained by each dimension. The *circle* indicates the clustering discussed in the running title

Table 2 Statistical significance of environmental variables determined by multivariate analysis based on the redundancy methodology (RDA)

	16S rRNA (*rrs*)		AOA (*amoA*)	
	Lambda 1	*p* Value	Lambda 1	*p* Value
Oil Mgv	**0.12**	**0.002**	0.02	0.706
Ant Mgv	**0.15**	**0.002**	**0.16**	**0.014**
Prs Mgv	**0.16**	**0.002**	0.06	0.698
Point 1	**0.05**	**0.018**	0.01	0.876
Point 2	0.03	0.218	0.01	0.180
Point 3	0.06	0.102	0.02	0.432
Oil contamination	**0.11**	**0.002**	0.02	0.768
Conductivity	**0.12**	**0.002**	0.03	0.194
Salinity	**0.12**	**0.002**	0.03	0.606

Values in bold are statistically significant factors that modulate the composition of archaeal communities according to the Monte Carlo permutation test ($p<0.05$)

overview of the archaeal groups present in the mangrove samples. From the 81 sequences of archaeal 16S ribossomal RNA, 44 were affiliated to the phylum Thaumarchaeota, 24 to the phylum Euryarchaeota, and the other 13 sequences showed higher similarities with unclassified archaea (Fig. 3). No sequences belonging to the phyla Korarchaeota or Nanoarchaeota were detected in the samples. Considering those sequences belonging to the Thaumarchaeota phylum, only one has shown high similarity with archaea already cultured (sequence MgvArc41). Other sequences affiliated to this group were clustered with sequences retrieved from environmental samples and mostly identified as *uncultured archaeon clone* (see Fig. 3). On the other hand, the sequences allocated within the phylum Euryarchaeota have shown similarities with already known and well-characterized archaeal groups, most of them described as promoters of the methanogenesis like the genera *Methanoculleus*, *Methanolobus*, *Methanosaeta*, *Methanobrevibacter*, and *Methanobacterium* (see Fig. 3).

It was also observed that mangroves harbor archaeal *amoA* sequences related to those already described in other samples collected in different environments such as soil samples and from the water column. The extent of the cluster affiliated with soil/sediment sequences has revealed the formation of four subgroups encompassing the 33 sequences, while the cluster encompassing the marine sequences has incorporated 29 sequences from mangroves, subdivided in three clusters (Fig. 4). Also, the formation of two possible mangrove-exclusive branches on the phylogenetic tree was observed: Mgv-amoA-I (7 sequences) and Mgv-amoA-II (18 sequences). Both clusters are allocated within the soil/sediment group, and both have a high bootstrap value (100 and 92, respectively; see Fig. 4).

3.4 Determination of OTUs, estimative of richness and rarefaction analysis of clone libraries

The 81 *rrs* gene sequences were clustered into 47 OTUs (cutoff value of 97%), representing 25 OTUs of Thaumarchaeota, 14 OTUs of Euryarchaeota, and 8 OTUs of unclassified *Archaea* group (13 sequences,8 OTUs; Table 3). Based on these OTUs, the richness of archaea in mangroves was estimated, ranging from 141 to 148 phylotypes (with a maximum of 267 within the deviation value; see Table 3). In a similar approach for *amoA* genes, the values were lower, indicating the limited variability of organisms carrying such genes in the mangrove environment (see Table 3). Considering the same cutoff level (97%), the number of OTUs was determined as 29, comprising 18 OTUs related to soil/

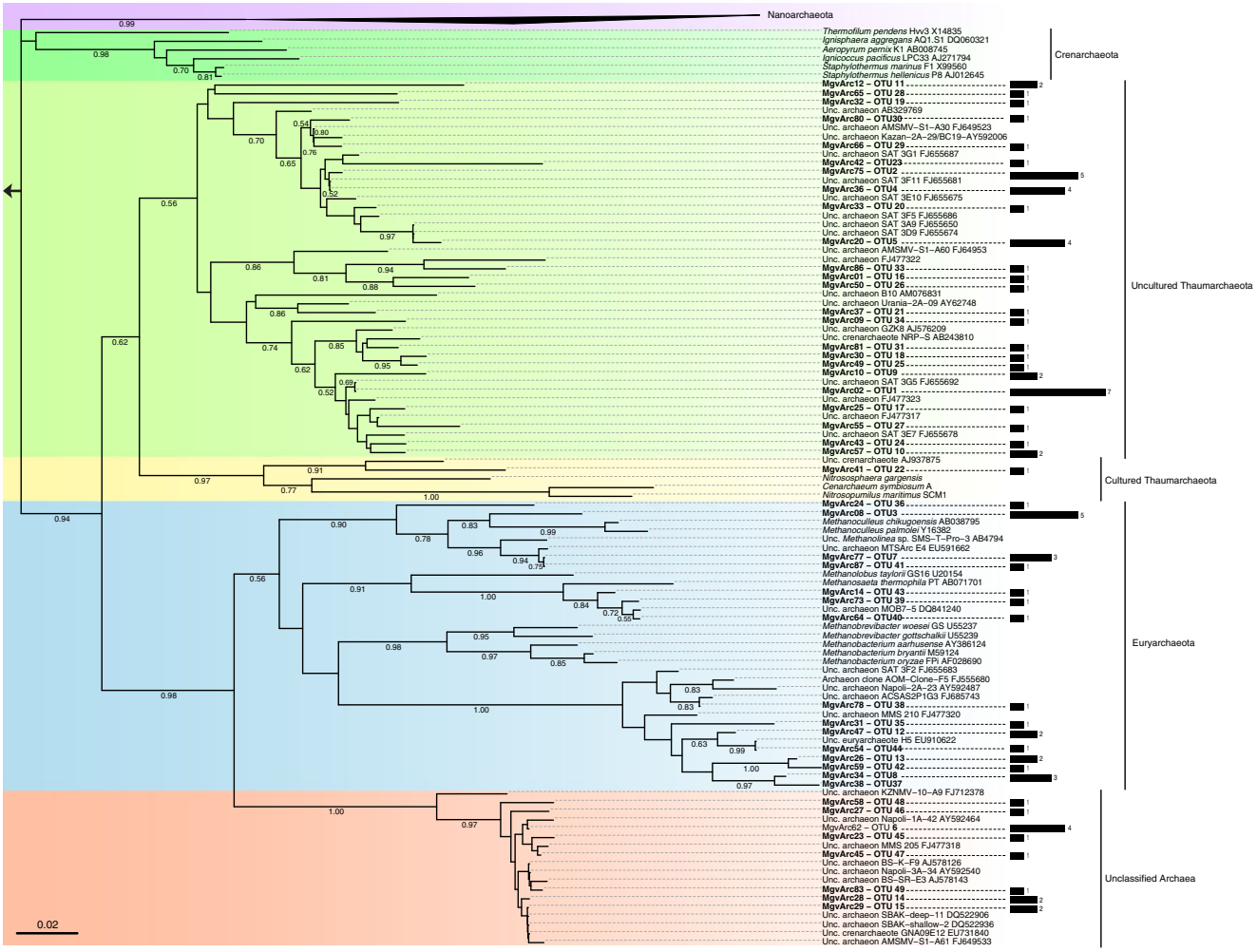


Fig. 3 Phylogenetic affiliations of *rrs* genes in archaeal clones retrieved from mangrove sediment samples. *Bars* indicate the number of sequences allocated in each of the 47 OTUs. The *scale bar* indicates the number of base substitutions per site, and the *values in nodes* indicate percentage of bootstrap values (total of 1,000 repetitions). There were a total of 622 aligned nucleotide positions in the final data set of the 16S rRNA gene. Gene sequences of *Nanoarchaeota* served as an outgroup. Sequences from the 16S rRNA clones are available in the GenBank database under codes GU993946–GU993995. The *scale bar* indicates the number of base substitutions per site, and the *values in nodes* indicate percentage of bootstrap values (total of 1,000 repetitions)

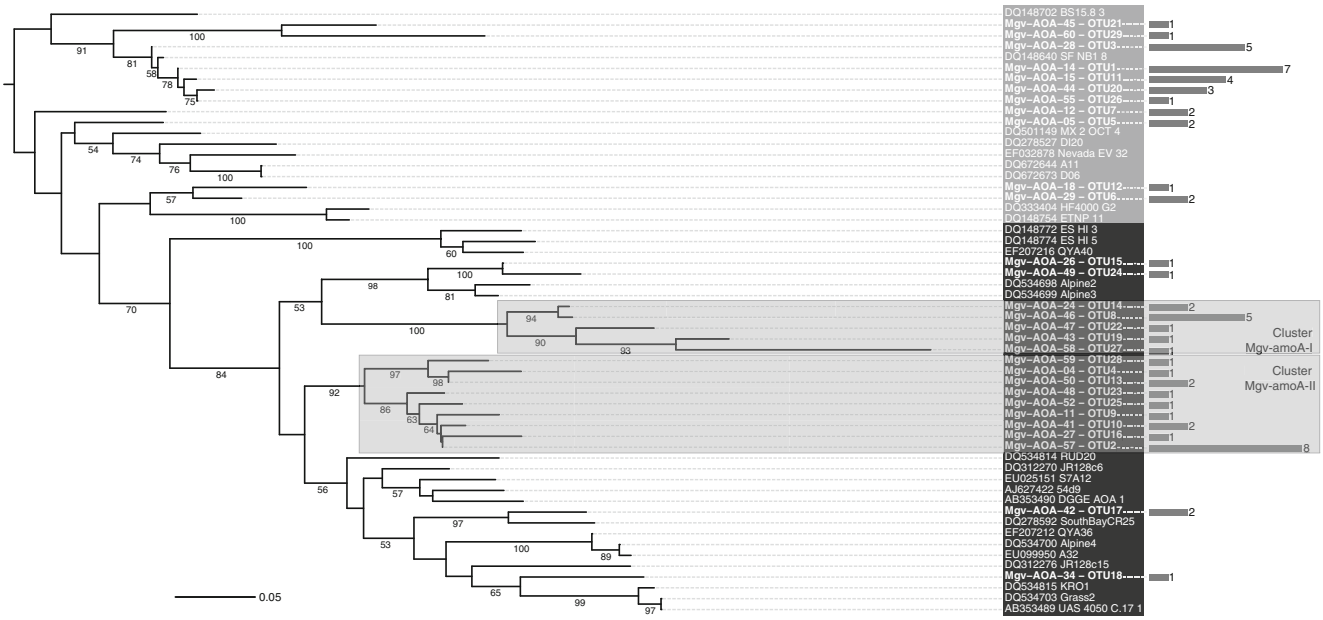


Fig. 4 Phylogenetic affiliation of *amoA* genes in archaeal clones retrieved from mangrove sediment samples. *Black* represents the sequences affiliated with the soil/sediment phylogeny set, and *gray* represents the sequences affiliated with the water column domain. There were a total of 503 aligned nucleotide positions in the final data set of the *amoA* gene. Sequences from *amoA* clones are available in the GenBank database under codes GU993917–GU993945. *Bars* indicate the number of sequences allocated in each of the 29 OTUs. The scale bar indicates the number of base substitutions per site, and *values in nodes* indicate percentage of bootstrap values (total of 1,000 repetitions)

sediment sequences and 11 OTUs within the cluster from the water columns. The application of richness estimators resulted in values of 44 and 55 for *Cha*oI and ACE, respectively. Such low numbers of phylotypes were observed when lower values of cutoff were used (85 and 90%), with values of 20 and 26 phylotypes (*Cha*oI and ACE) for similarity level of 90%, and 15 and 17 for 85% similarity.

Rarefaction curves showed proximity to the plateau for *amoA* analysis with the number of analyzed sequences, while sequences of *rrs* indicated a lower but reasonable coverage of total archaeal community in mangroves (Fig. 5).

4 Discussion

The diversity and complexity of microbial communities has been described in a wide variety of environments, where these organisms are involved in distinct functions that help to maintain the system. In this context, mangroves have not been explored to the same extent as other environments. Here, we present a study to partially fill this gap, providing not only a simple description of the archaeal diversity in mangrove sediments, but also comparing (by DGGE) the profiles of these communities in distinct mangroves, under different states of preservation and contamination. Moreover, we also infer the occurrence and diversity of the

Table 3 Number of sequences, OTUs, and richness indices for archaeal groups in mangrove sediments

Targeted communities	Number of sequences/OTUs	Richness indices	
		*Cha*oI	ACE
Total archaea	81/47	141 (89–267)	148 (96–262)
Thaumarchaeota	43/24	66 (40–146)	73 (44–154)
Euryarchaeota	24/14	30 (18–79)	33 (19–85)
Unclassified	13/8	17 (11–46)	24 (13–78)
amoA [a]	62/29	44 (33–78)	55 (39–101)

Values were estimated by grouping sequences in OTUs at 97% similarity

[a] Values of OTUs, *Cha*oI, and ACE estimators considering 90% and 85% of similarity for *amoA* gene analysis are presented in the text

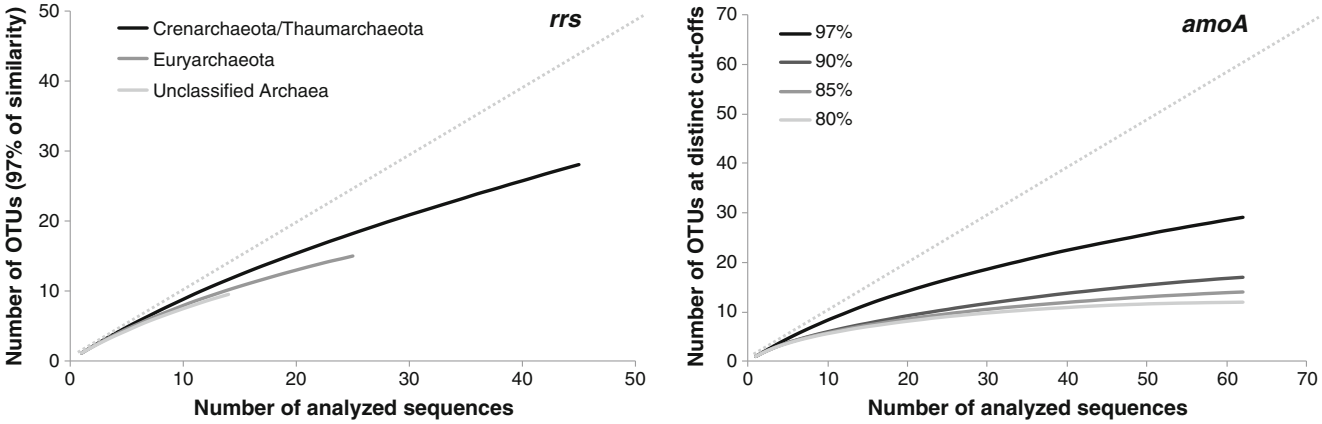


Fig. 5 Rarefaction analyses for libraries of *rrs* and *amoA* genes found in mangrove sediment samples. Distinct archaeal groups are represented at 97% of similarity OTUs, and *amoA* gene was analyzed under distinct cutoff values. *Dotted lines* indicate the equation $x=y$ in order to facilitate the saturation visualization

functional *amoA* gene, which is involved in nitrogen cycling (Caffrey et al. 2007; Santoro et al. 2008). Hence, the selection of the mangrove as the study environment was not only due to its limited investigation but also due to the characteristics found in this ecosystem such as salinity and frequent anoxic conditions (Holguin et al. 2001; Ferreira et al. 2010). Due to their locations at the transition from land to sea and under the influence of tides and river flow, mangroves are believed to contain archaeal communities that are adapted to these ever-changing conditions.

In this study, changes were observed, based on the variation of DGGE bands intensities in archaeal communities found in three distinct mangroves and sampling points within them. These changes were further validated statistically by ordination analysis, which allowed the determination of the parameters influencing the structure of these communities. Among the parameters found (distinct mangrove characteristics, salinity, and oil contamination), some were already identified for bacterial changes in mangrove sediments, as oil contamination (Taketani et al. 2010a) or the mangrove location (Gomes et al. 2008; Dias et al. 2010). In addition to the variables included in the ordination analysis, other environmental parameters (not included in the ordination analysis due to absence of true replicates) were distinct in the studied areas, with the most different area located at Point 1 of the Prs Mgv. In this mangrove area, the higher values of total carbon and organic carbon, might also explain the higher content of total nitrogen in the sediments. Such differences in comparison to other points might be explained by two factors: (i) the intense deposition of organic matter in the mangrove area near to the sea; and (ii) the forest structure, with higher trees in this area, resulting in a more intense deposition of tree-derived material in these sediments.

The analyses of DGGE patterns for the *amoA* genes were similar in all samples. One possibility for the absence of variation in *amoA*-based DGGE could be due to the limited differences found in important environmental parameters described in the composition of ammonia-oxidizing archaea (see Table 1). Other studies have described several environmental parameters which are able to modify the structure of ammonia-oxidizing archaeal communities, as reviewed by Erguder et al. (2009). However, the absence of variation found in this study, even along a salinity gradient [which was previously described as an important feature by Santoro et al. (2008) in estuarine samples] remains to be explained. Possibly, in mangroves, other environmental variables exert a higher selection pressure over the ammonium-oxidizing archaeal communities. Also, taking these observations into consideration, one can claim that such low variations of *amoA* genes are related to the low availability of oxygen in such environments, which would favour primarily anaerobic processes, such as the anaerobic ammonium oxidation performed by the anammox bacteria (Strous et al. 1999). The study performed by Li et al. (2010) conclude that ammonia-oxidizing organisms can take advantage of aerobic spots generated by the constant shifting in aerobic and anaerobic conditions caused by the tidal regime, making the balance of nitrification and other nitrogen transformations variable over time in these sediments. These observations allowed the suggestion that the conditions causing the occurrence of distinct nitrogen transformations has yet to be explored in mangrove sediments. This research need must be addressed by studies focused on the biochemical characterization of such sediments, linking the molecular diversity of mangrove inhabitants with the detection of specific microbial activities and specific environmental parameters, for example, the available oxygen, and the amount of distinct nitrogen forms (ammonium, nitrite, and nitrate) available in mangrove sediments.

The only previous study of archaeal communities in mangrove sediments was performed in a Chinese mangrove (Yan et al. 2006). In that study, the authors found two major archaeal groups affiliated to the phyla Crenarchaeota and Euryarchaeota. The results obtained in the present study partially corroborate that study, with a similar dominance of Thaumarchaeota (which encompass most of the groups previously affiliated to Crenarchaeota) and Euryarchaeota phyla. However, while in the Chinese mangrove, the frequencies of archaeal groups were 80.4% and 19.6% for Crenarchaeota and Euryarchaeota, respectively; the frequency of sequences affiliated to these archaeal groups in the Brazilian mangroves were 53.6% and 29.8%, respectively. Another difference is related to the other 16.6% of sequences affiliated to an unclassified group of archaea found in this study but not mentioned in the Chinese mangrove analysis. With regard to phylogeny, the presence of sequences affiliated with unclassified archaea indicates that mangroves may serve as sources for broader and better descriptions of archaeal groups.

In relation to the phylogeny of the *amoA* sequences and the locations of the mangroves, this study showed sequences that were similar to those from water columns and also from soil/sediment samples. The balance between ammonia oxidation performed by archaea and bacteria is described as divergent in different environments, with the dominance of one group over another depending on the characteristics of the samples (Beman et al. 2008; Erguder et al. 2009). Bernhard et al. (2010) found that ammonia-oxidizing archaea are predominant over bacteria in estuarine saline environments and that most *amoA* genes are related to other marine and estuarine environments. Controversially, Glaser et al. (2010) found that bacteria predominate over archaea in ammonium oxidation from bulk soil and rhizosphere of barley, where most of the clones of archaeal *amoA* were positioned in the soil cluster and not in the marine or sediment clusters. Li et al. (2010) assessed the diversity of ammonia oxidizing archaea and bacteria in mangroves sediments, finding all sequences of archaeal *amoA* affiliated to those from seawater, waste water, and estuarine sediment samples. This finding does corroborate with the results from this study, where the co-occurrence of these groups indicates that the mangrove location, as a transitional environment, serves as a shelter for both sets of *amoA* gene types, from sea and soil. In addition, another common observation made in this study and Li et al. (2010) is the presence of possibly specific *amoA* genes in mangroves. Here, the formation of two clusters (encompassing a total of 25 sequences) separated from other *amoA* sequences by high values of bootstrap was observed, indicating a possible selection of the mangrove sediments over the structure of *amoA* gene. Similar results were obtained by Taketani et al. (2010b), assessing the methanogenic archaea and sulfate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. These authors found sequences of methyl coenzyme-M reductase (*mcrA*) and dissimilatory sulfate reductase (*dsrB*) with low similarities to those described in other environments. It does corroborate the hypothesis that mangroves contain a specific diversity of organisms, and alternative structures of enzymes, which are able to promote their activities under the environmental conditions found in these ecosystems.

5 Conclusions

This study has shown how archaeal communities are structured in three Brazilian mangroves. DGGE analysis has indicated that, although these organisms displayed similar community structures in the three distinct mangroves evaluated, the relative abundance of specific populations may vary between and within mangroves. Also, the presence of archaeal *amoA* genes might indicate that ammonium oxidation by archaea may play a role in nitrogen transformations in mangroves. Moreover, these findings indicate that the archaeal communities are responsible for modification of the mangroves' preservation caused by the pressure exerted by anthropogenic activities.

Acknowledgments This study was supported by a grant from the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP/BIOTA 2004/13910-6). F.D. Andreote received a postdoctoral fellowship from FAPESP (2007/56360-4), and R.G. Taketani was a recipient of a postdoctoral grant from CNPq. Also, A.C.F. Dias received a graduate fellowship (2008/54013-8). We also thank the support from the Oceanographic Institute (IO, USP, São Paulo), especially Dr. Ricardo P. Menghini and João L. Silva for their support in mangrove expeditions and samplings.

References

Andreote FD, Azevedo JL, Araújo WL (2009) Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. Braz J Microbiol 40:417–432

Beman JM, Popp BN, Francis CA (2008) Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. ISME J 2:429–441

Bernhard AE, Landry ZC, Blevins A, de la Torre JS, Giblin AE, Stahl DA (2010) Abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria along an estuarine salinity gradient in relation to potential nitrification rates. Appl Environ Microbiol 76:1285–1289

Caffrey JM, Bano N, Kalanetra K, Hollibaugh JT (2007) Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. ISME J 1:660–662

Dias ACF, Andreote FD, Rigonato J, Fiore MF, Melo IS, Araújo WL (2010) The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. Antonie Van Leeuwenhoek 98:541–551

Erguder TH, Boon N, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W (2009) Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia oxidizing archaea. FEMS Microbiol Rev 33:855–869

Ferreira TO, Otero XL, Souza VS Jr, Vidal-Torrado P, Macías F, Firme LP (2010) Spatial patterns of soil attributes and components in a mangrove system in Southeast Brazil (São Paulo). J Soil Sediment 10:995–1006

Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. Proc Natl Acad Sci USA 102:14683–14688

Francis CA, Beman JM, Kuypers MMM (2007) New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. ISME J 1:19–27

Fuhrman JA, McCallum K, Davis AA (1992) Novel major archaebacterial group from marine plankton. Nature 356:148–149

Glaser K, Hack E, Inselsbacher E, Strauss J, Wanek W, Zechmeister-Boltenstern S, Sessitsch A (2010) Dynamics of ammonia-oxidizing communities in barley-planted bulk soil and rhizosphere following nitrate and ammonium fertilizer amendment. FEMS Microbiol Ecol 74:575–591

Gomes NCM, Borges LR, Paranhos R, Pinto FN, Mendonça-Hagler LCS, Smalla K (2008) Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. FEMS Microbiol Ecol 66:96–109

Holguin G, Vazquez P, Bashan Y (2001) The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of the mangrove ecosystems: an overview. Biol Fertil Soils 33:265–278

Karner MB, DeLong EF, Karl DM (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. Nature 409:507–510

Kathiresan K, Bingham BL (2001) Biology of mangroves and mangrove ecosystem. Adv Mar Biol 40:81–251

Li M, Cao H, Hong Y, Gu JD (2010) Spatial distribution and abundances of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in mangrove sediments. Appl Microbiol Biotechnol 89:1243–1254

Lyimo TJ, Pol A, Jetten MS, den Camp HJ (2009) Diversity of methanogenic archaea in a mangrove sediment and isolation of a new Methanococcoides strain. FEMS Microbiol Lett 291:247–253

Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 59:695–700

Nicol GW, Schleper C (2006) Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? Trends Microbiol 14:207–212

Øvreas L, Forney L, Daae FL, Torsvik V (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 63:3367–3373

Sahan E, Muyzer G (2008) Diversity and spatio-temporal distribution of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in sediments of the Westerschelde estuary. FEMS Microbiol Ecol 64:175–186

Santoro AE, Francis CA, Sieyes NR, Boehm AB (2008) Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary. Environ Microbiol 10:1068–1079

Schloss PD, Handelsman J (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. Appl Environ Microbiol 71:1501–1506

Sousa OV, Macrae A, Menezes FGR, Gomes NCM, Vieira RHSF, Mendonça-Hagler LCS (2006) The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceara, Brazil. Mar Pollut Bull 52:1725–1734

Strous M, Fuerst JA, Kramer EHM, Logemann S, Muyzer G, van de Pas-Schoonen KT, Webb R, Kuenen J, Jetten MSM (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete. Nature 400:446–449

Taketani RG, Franco NO, Rosado AS, van Elsas JD (2010a) Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. J Microbiol 48:7–15

Taketani RG, Yoshiura CA, Dias ACF, Andreote FD, Tsai SM (2010b) Diversity and identification of methanogenic archaea and sulphate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. Antonie Van Leeuwenhoek 97:401–411

Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, Schuster SC, Klenk H-P, Schleper C (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crearchaeota in nitrogen cycling. Environ Microbiol 7:1985–1995

Van Raij B, Cantarella H, Andrade JC, Quaggio JA (2001) Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas: Instituto Agronômico 285 p

Woese CR, Kandler O, Wheels ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria, and eukarya. Proc Natl Acad Sci USA 87:4576–4579

Yan B, Hong K, Yu ZN (2006) Archaeal communities in mangrove soil characterized by 16S rRNA gene clones. J Microbiol 44:566–571

Applied and Environmental Microbiology

Abundance and Genetic Diversity of *nifH* Gene Sequences in Anthropogenically Affected Brazilian Mangrove Sediments

Armando Cavalcante Franco Dias, Michele de Cassia Pereira e Silva, Simone Raposo Cotta, Francisco Dini-Andreote, Fábio Lino Soares Jr., Joana Falcão Salles, João Lúcio Azevedo, Jan Dirk van Elsas and Fernando Dini Andreote

Appl. Environ. Microbiol. **2012, 78(22):7960. DOI: 10.1128/AEM.02273-12.**
Published Ahead of Print 31 August 2012.

Updated information and services can be found at:
http://aem.asm.org/content/78/22/7960

These include:

REFERENCES

This article cites 41 articles, 11 of which can be accessed free at: http://aem.asm.org/content/78/22/7960#ref-list-1

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), more»

Information about commercial reprint orders: **http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml**
To subscribe to to another ASM Journal go to: **http://journals.asm.org/site/subscriptions/**

Journals.ASM.org

Downloaded from http://aem.asm.org/ on October 23, 2012 by University of Groningen

AEM
Journals.ASM.org

Abundance and Genetic Diversity of *nifH* Gene Sequences in Anthropogenically Affected Brazilian Mangrove Sediments

Armando Cavalcante Franco Dias,[a,d] Michele de Cassia Pereira e Silva,[c] Simone Raposo Cotta,[b] Francisco Dini-Andreote,[c] Fábio Lino Soares, Jr.,[a] Joana Falcão Salles,[c] João Lúcio Azevedo,[a] Jan Dirk van Elsas,[c] and Fernando Dini Andreote[d]

Center for Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo, CENA/USP, Piracicaba, Brazil[a]; Department of Microbiology Paulo de Góes, URFJ/RJ, University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil[b]; Department of Microbial Ecology, Center for Ecological and Evolutionary Studies (CEES), University of Groningen (RUG), Groningen, the Netherlands[c]; and Department of Soil Science, ESALQ/USP, University of São Paulo, Piracicaba, Brazil[d]

Downloaded from http://aem.asm.org/ on October 23, 2012 by University of Groningen

Although mangroves represent ecosystems of global importance, the genetic diversity and abundance of functional genes that are key to their functioning scarcely have been explored. Here, we present a survey based on the *nifH* gene across transects of sediments of two mangrove systems located along the coast line of São Paulo state (Brazil) which differed by degree of disturbance, i.e., an oil-spill-affected and an unaffected mangrove. The diazotrophic communities were assessed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), quantitative PCR (qPCR), and clone libraries. The *nifH* gene abundance was similar across the two mangrove sediment systems, as evidenced by qPCR. However, the *nifH*-based PCR-DGGE profiles revealed clear differences between the mangroves. Moreover, shifts in the *nifH* gene diversities were noted along the land-sea transect within the previously oiled mangrove. The *nifH* gene diversity depicted the presence of nitrogen-fixing bacteria affiliated with a wide range of taxa, encompassing members of the *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes*, and also a group of anaerobic sulfate-reducing bacteria. We also detected a unique mangrove-specific cluster of sequences denoted Mgv-*nifH*. Our results indicate that nitrogen-fixing bacterial guilds can be partially endemic to mangroves, and these communities are modulated by oil contamination, which has important implications for conservation strategies.

Mangroves are widely distributed in the Earth's tropical and subtropical regions, covering approximately 60 to 75% of the global coastline (16, 33). Brazil, Indonesia, and Australia are the countries that possess the most mangrove areas (18). The importance of mangrove ecosystems lies in their great biological productivity, serving as a source of life for a high diversity of fish, crustaceans, mollusks, birds, reptiles, and mammals. In this context, microorganisms are important, as they are involved in the processing of essential compounds that sustain the higher organisms (1, 11, 18). Any environmental disturbance, depending on its frequency and intensity, caused either by natural or anthropogenic factors may put mangroves in an unsustainable situation, harming the key life support processes (12, 19, 20).

The availability of nitrogen limits primary production in many terrestrial and marine ecosystems. Biological nitrogen fixation is the dominant natural process by which atmospheric nitrogen enters ecosystems through its conversion into ammonia (30, 39, 40, 41). The provision of nitrogen to mangroves has been described as associated with organic matter decomposition. Marine environments often also have high rates of biological nitrogen fixation (BNF) (17, 24). For organisms to fix nitrogen, either in association with plants or not, the presence and activity of the nitrogenase enzyme complex is required (29). In mangrove sediments, the rate of nitrogen fixation is affected by the pool of dissolved inorganic nitrogen and by local conditions (21). In this context, N_2 fixation is particularly significant in sediment settings, where prevailing anaerobic or microaerophilic conditions regulate nitrogen transformations as well as nitrogen losses to the atmosphere (4).

In order to monitor the microbial potential for nitrogen fixation, many studies have used the *nifH* gene as a proxy for abundance and diversity (8, 26, 28, 36). This gene has revealed sufficient variation to allow the detection of shifts in the community structure of nitrogen fixers in ecosystems under differing conditions (3), as well as shifts promoted by alterations over time and related to soil type and chemical properties (27).

In this study, we determined the abundance and diversity of diazotrophic bacterial communities present in the sediments of two distinct mangroves. Our primary purpose was to assess the effect of prior oil pollution on the diversity of these assemblages, identifying the major groups of organisms that are capable of contributing to N_2 fixation. We used samples along transects in the two mangroves that differed in vegetation composition and some environmental parameters (see below), making this survey complementary to other assessments in the same area where shifts in archaeal (10) and fungal (13) communities were demonstrated. Indeed, the abundance of genes related to nitrogen transformations and the occurrence of *nifH*-related genes in these areas was also observed by a deep metagenomic survey carried out by our team (2), basing our approach on determining specific players of nutrient cycling in such areas.

MATERIALS AND METHODS

Mangroves and samples analyzed. The two mangroves, near to the city of Bertioga, Sao Paulo, were selected based on their proximity to each other and their distinct history of contamination. They were denoted Bertioga Anthropogenic (AntMgv) (free of oil but near the city) and Bertioga Contaminated (OilMgv). The latter experienced an oil spill, having been contaminated with 35 million liters of oil in 1983. Both mangroves have as

Received 19 July 2012 Accepted 28 August 2012
Published ahead of print 31 August 2012
Address correspondence to Fernando Dini Andreote, fdandreo@gmail.com.
Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/AEM.02273-12

TABLE 1 Characteristics and history of contamination of the mangroves analyzed in this study

Mangrove metagenome	Description	Coordinates	Contamination	Vegetation
OilMgv1	Area free of oil contamination in the OilMgv	23°53′49″ S, 46°12′28″ W	Small effect of oil spill	Presence of mangrove species,[a] predominance of *R. mangle*
OilMgv2-3	Area highly affected by the oil contamination in the OilMgv	23°53′49″ S, 46°12′28″ W	Highly affected by oil spill	Under recovery, low density of *Rhizophora mangle*
AntMgv	Mangrove near the city, under anthropogenic pressure	23°54′06″ S, 45°15′03″ W	From human activity	Abundant existence of other species besides those typically found in mangroves

[a] In the state of Sao Paulo, the mangrove forest is composed mainly of three species: *Avicennia shaueriana*, *Laguncularia racemosa*, and *Rhizophora mangle*.

water sources mixtures of water from the sea and from the river Iriri, which crosses the area.

A transect of approximately 300 m was determined in each mangrove, oriented from the waterfront toward inland. Three easily distinguishable subregions were outlined, i.e., a first region 50 m from a local river (denoted site 1), a second in the center of the mangrove (denoted site 2), and a third far inland, called restinga, around 30 m from a transition between mangrove and forest. The two mangroves can also be divided into distinct areas based on their vegetation and characteristics (Table 1). The OilMgv is easily divided in two subregions separated by a small stream that crosses the mangrove. In the area landward of the river, oil effects were still present, while the area closer to the sea in the same mangrove did not show effects of the oil spill and vegetation was more similar to that of the other mangrove (AntMgv) (Table 1). A better visualization of these points and more details on vegetation composition and other parameters can be found in a previous study involving the same area (2).

Triplicate samples were collected perpendicularly to the transect, separated from each other by at least 30 m. Sample grouping thus consisted of three replicates taken at each site within each mangrove. This yielded a total of 18 samples (2 mangroves at 3 points, with 3 replicates from each point). Each sediment sample was obtained with a 30-cm sampler, 7 cm in diameter, which was placed in the mangrove sediment and removed, resulting in sediment cores of approximately 1 kg.

All samples were subjected to physical and chemical analyses, determining the major soil characteristics (Table 2). These analyses were carried out in collaboration with the Laboratory of Soil Analysis at "Luiz de Queiroz" College of Agriculture (ESALQ/USP; Piracicaba, Brazil) according to the methodology described by Van Raij et al. (Table 2) (39a). Also, although oil components were not determined, the presence of oil is visible in the spilled area, mainly in the undersurface layers (30 to 50 cm depth).

DNA extraction from sediment samples. Total DNA was extracted from each sample using the PowerSoil DNA Isolation kit (Mobio, NY). After extraction, the quantity, integrity, and quality of the DNA obtained were checked by 1% (wt/vol) agarose gel electrophoresis, followed by staining in ethidium bromide and visualization in UV light. The extracted DNA was further quantified by NanoDrop spectrophotometer analysis (Thermo Scientific).

Quantification of *nifH* gene copies by qPCR. The abundance of nitrogen fixers was quantified by quantitative PCR (qPCR) targeting the *nifH* gene. The reactions were performed in an ABI Prism 7300 Cycler (Applied Biosystems, Germany) in volumes of 25 μl and containing 1 μl of extracted DNA (approximately 50 ng), 12.5 μl of Power SYBR green master mix (Applied Biosystems), and 0.25 μM primers FGPH19 (35) and PolR (28). The parameters were those previously described in the literature (27, 36). Briefly, the amplifications were performed with one initial denaturation step at 94°C for 1 min, followed by 40 amplification cycles of 55°C for 27 s and an extension of 1 min at 72°C. The specificity of the amplification products was confirmed by melting curve analysis, and the expected sizes (450 bp) of the amplified fragments were checked in a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Standard curves were obtained using serial dilutions of the *Escherichia coli*-derived vector plasmid JM109 (Promega, Madison, WI) containing a cloned *nifH* gene from *Bradyrhizobium liaoningense*, using 10^2 to 10^7 gene copies μl^{-1}. Threshold values obtained from sample amplification were interpolated in the standard curve determining the number of *nifH* genes found per gram of mangrove sediment.

Analysis of nitrogen-fixing communities in mangrove sediment using PCR-DGGE. The total DNA extracted from all mangrove samples was subjected to amplification using specific primers described in the literature (28, 35) for denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis

TABLE 2 Environmental data and results from global BEST test[a]

	Result by mangrove and test point							
	OilMgv			AntMgv				
Variable	P1	P2	P3	P1	P2	P3	Global *R*	*P* value
pH	6.9	6.8	6.4	7.1	6.8	6.9	**0.253**	**0.001**
Density (g/cm^3)	0.96	0.96	0.95	0.96	0.95	0.96	0.148	NS
Humidity (%)	65.16	69.66	48.26	73.97	78.39	75.82	0.064	NS
Organic matter (%)	10.86	12.89	10.89	10.28	9.89	11.43	0.138	NS
Total carbon (%)	6.03	7.16	6.05	5.71	5.5	6.35	0.093	NS
Total nitrogen (%)	5.33	5.6	5.15	4.77	4.62	5.19	**0.287**	**0.001**
Total sulfur (%)	0.13	0.45	0.31	0.29	0.26	0.34	**0.311**	**0.001**
Conductivity (mS)	0.31	0.36	0.32	0.24	0.26	0.2	0.024	NS
Salinity (%)	7.77	8.01	8.84	5.56	8.22	8.36	0.197	NS
Sandy (%)	0.47	0.46	0.48	0.3	0.46	0.46	0.088	NS

[a] Results from the global BEST test were determined in Primer-E software, which selects environmental variables best explaining community pattern as assessed by DGGE profiles. Values in bold indicate statistically significant variables. NS, not significant.

Downloaded from http://aem.asm.org/ on October 23, 2012 by University of Groningen

of the *nifH* gene (27). The amplicons obtained were checked on agarose gels before DGGE analysis, which was performed in an Ingeny PhorU2 system (Ingeny, Goes, the Netherlands) with a 40 to 65% denaturing gradient (where 100% denaturant consisted of 7 M urea and 40% formamide) and 6.0% polyacrylamide. Electrophoresis was initiated at 60°C and maintained at 100 V for 16 h. After electrophoresis, gels were stained with SYBR Gold with a final concentration of 0.5 mg liter^{-1} (Invitrogen, Breda, the Netherlands) and photodocumented in UV light. Images of the gels were obtained with Image Master VDS (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, United Kingdom) and stored as TIFF files.

DGGE patterns were compared by clustering the different lanes by Pearson's correlation implemented in GelCompar II software (Applied Maths, Sint-Martens Latem, Belgium) using the unweighted-pair group method with arithmetic means (UPGMA). Additionally, differences in multivariate aspects of community structure between treatments were determined with multidimensional scaling ordination (MDS) of square root-transformed species abundance data using the Bray-Curtis similarity measure, and their significance was assessed by two-way analysis of similarities (ANOSIM) in PRIMER (version 6; Primer-E Ltd., Plymouth, United Kingdom) (7). ANOSIM produces a test statistic, *R*, and a significance level, *P*. Values of *R* closer to 0 implied no differences between samples. The correlation between community structure and physicochemical parameters were tested using a global BEST test in Primer-E software (with a Spearman coefficient and 5,000 permutations), which selects environmental variables best explaining community patterns by maximizing a rank correlation between their respective resemblance matrices. The relationships between the physicochemical parameters were tested using Pearson's correlation in SPSS Statistics 20.

Construction and analysis of *nifH* gene clone libraries. The DNA extracted from each sample was used to construct *nifH*-based clone libraries (one per subregion of sampling points due to the high similarity of replicates for DGGE analysis). The template DNA was subjected to amplification with specific primers for the *nifH* gene according to the methodology previously described (36). The amplification products were purified using the Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega, Madison, WI) and inserted into pGEM-T using the pGEM-T Easy Vector system kit (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. The colonies that exhibited vector inserts (white color) were selected for insert detection by amplification with the M13F and M13R primers. The resulting PCR products with the inserts were sent for sequencing at AGOWA (Berlin, Germany). Using this methodology, 458 clones containing *nifH* gene inserts were obtained. Sequences were trimmed to remove poor quality, and vector sequences were removed with the Lucy program, available from the Ribosomal Database Project.

Sequence analyses were performed at the level of nucleotides by phylogeny-based approaches and also by applying operational taxonomic unit (OTU)-based analyses using the MOTHUR program (34). The phylogeny-based analysis was made by comparing the obtained sequences to those from public databases (GenBank and Fungene) in neighbor-joining (31) trees constructed using MEGA 4.0 (38) with the Kimura 2-parameter method. The bootstrap consensus tree inferred from 1,000 replicates was taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. Branches corresponding to partitions reproduced in fewer than 50% bootstrap replicates were collapsed.

Nucleotide sequence accession numbers. The sequences reported in this study were deposited in GenBank under the accession numbers JQ237691 to JQ237760.

RESULTS

Abundance of *nifH* in the mangrove sediments. The *nifH* gene was detected and quantified across all sediment samples. The efficiency value for amplification of this target gene was 99.26%, and logarithmic regression curves (R^2) reached a value of 0.99. The amplification specificity was found to be robust, with single peaks being detected during melting curve analysis.

TABLE 3 Quantification of *nifH* gene copies per sample site determined by qPCR[a]

Mangrove	Copies of the target gene per gram of sediment (log x + 1) at point:		
	1	2	3
OilMgv	6.81 ± 0.54	7.26 ± 0.26	7.22 ± 0.21
AntMgv	7.40 ± 0.05	6.88 ± 0.07	6.87 ± 0.19

[a] The R^2 of the standard curve was greater than 0.99. The qPCR estimated efficiency was 99.26%. Values are means from three replicates (n = 3) ± standard errors.

Statistically similar *nifH* gene densities ($P > 0.05$) were observed between the two mangrove sample sets (oil polluted and free of oil) and among distinct sampling points ($P > 0.05$), with average values ranging from 6.81 to 8.26 log *nifH* copies per g sediment (Table 3). The lack of differences in *nifH* gene densities may have been due to the high variability across the replicate from point 1 in the oil-polluted mangrove (OilMgv). However, in spite of the lack of statistical support, a trend toward an increase of the abundance of *nifH* copies at point 1 was observed in the non-oil-affected mangrove, while numbers tend to be smaller at point 1 of the OilMgv (Table 3).

Community structure analysis based on the *nifH* gene. Analysis of the *nifH*-based PCR-DGGE profiles revealed that the numbers of bands per sample varied from 27 to 39. Furthermore, the profiles were qualitatively and quantitatively different, as different bands and/or band intensities were recorded in the different samples (Fig. 1a). The profile analysis by clustering (Pearson correlation) generated an external group encompassing all samples from the area near the sea in the oiled mangrove (OilMgv1). This cluster showed only 20% similarity to any of the other profiles. In this cluster, a separation between mangrove types was observed at 30% similarity, hence distinguishing other OilMgv samples from those obtained from AntMgv (Fig. 1a). In order to better visualize these clusters, an NMDS plot was generated in which three distinct groups emerged, encompassing profiles from oil site 1 (OilMgv1), oil sites 2 and 3 (OilMgv2-3), and the non-oiled mangrove (AntMgv) (Fig. 1b). ANOSIM analysis showed a significant effect of treatment (impacted versus not impacted; $R = 0.576$; $P = 0.02$), which is supported by the shifts observed in values of pH ($R = 0.253$; $P = 0.001$), total nitrogen ($R = 0.287$; $P = 0.001$), and sulfur content ($R = 0.311$; $P = 0.001$) (Table 2). Pearson's correlation revealed that these parameters did not interact significantly with each other or with the other measured environmental parameters.

Phylogenetic evaluation of nitrogen-fixer groups in the sample sites. The six clone libraries based on the *nifH* gene encompassed a total of 458 trimmed sequences. Phylogenetic analyses showed a dominance of sequences affiliated with *nifH* of diverse *Proteobacteria* (290 sequences; 210 for *Gammaproteobacteria* and 80 for the cluster containing *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria*), followed by anaerobic bacteria related to sulfate reducers (100 sequences), *Firmicutes* (11 sequences) (Fig. 2), and a cluster of Mgv-*nifH* (57 sequences) encompassing novel *nifH* sequences which showed low similarity to any other *nifH* sequences.

An OTU-based data treatment was then carried out in which all sequences were binned using a cutoff of 80% similarity at the nucleotide level. This data transformation yielded a total of 95

Downloaded from http://aem.asm.org/ on October 23, 2012 by University of Groningen

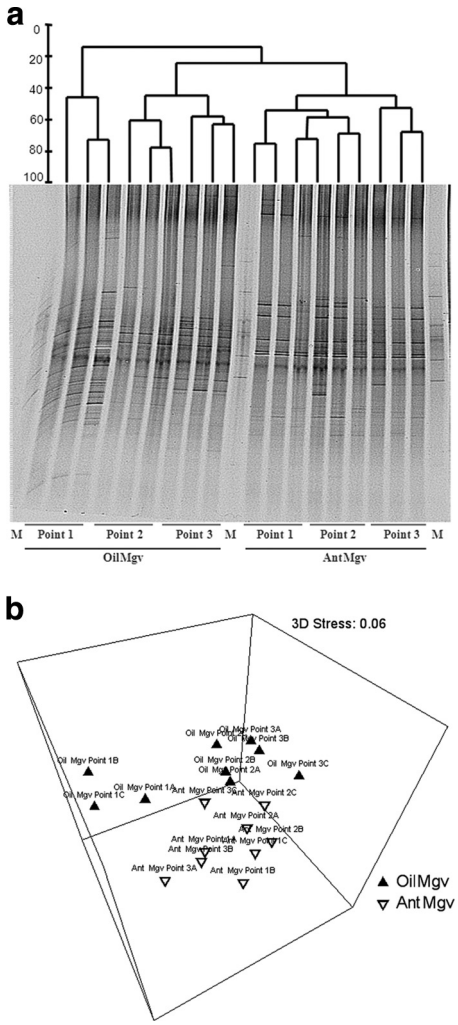


FIG 1 (a) PCR-DGGE profiles for nitrogen-fixing (*nifH*) bacteria. A standard *nifH* gene PCR-DGGE dendrogram was created using the UPGMA method based on the similarity calculated by densitometry. (b) Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) analysis comparing the *nifH* community based on Bray-Curtis similarities.

OTUs (encompassing all 458 sequences). While the two *nifH* groups within the *Proteobacteria* (*Gammaproteobacteria* and *Alpha*/*Betaproteobacteria*) appeared like low-diversity clusters (210 and 80 sequences fell into just 8 and 14 OTUs, respectively), anaerobic sulfate reducers and cluster Mgv-*nifH* represented high-diversity clusters (100 and 57 sequences, falling into 34 and 35 OTUs, respectively). *Firmicutes* showed an intermediate diversity (11 sequences falling into 4 OTUs) (Fig. 2).

The *nifH* clusters occurred differentially across the analyzed libraries. An analysis of the relative abundances of each cluster revealed that the *Alpha*/*Betaproteobacteria*, *Firmicutes*, and Mgv-*nifH* types showed similar average values, though *Alpha*/*Betaproteobacteria* abundances varied greatly across sites in the oiled mangrove. In contrast, differences were observed for the *Gammaproteobacteria nifH* type, which was more frequent in OilMgv (0.46) than in AntMgv (0.29). Also, the *nifH* group of anaerobic bacteria related to sulfate reduction was more frequent in AntMgv (0.42) than in OilMgv (0.16) (Fig. 2). Overall, in the more pristine mangrove, a relatively constant pattern was observed (AntMgv), whereas in the oil-polluted mangrove greater differences were found among samples. For instance, the frequency of *Gammaproteobacteria*-type *nifH* decreased and the frequency of *nifH* of *Alpha*/*Betaproteobacteria* increased along the transect from sea to inland (Fig. 2). Moreover, in the area most affected by the oil spill (points 2 and 3 in the OilMgv), increases of *nifH* sequences affiliated with *Firmicutes* were found.

The phylogenetic affiliation of the sediment-derived sequences was then assessed in detail by including them in prestructured trees as described by Diallo et al. (8) and Mehta et al. (25). Many sediment *nifH* sequences turned out to be affiliated with those from uncultured organisms. In addition, others clustered with sequences without clear designation but that were obtained from genera described as nitrogen fixers, i.e., *Sinorhizobium* (Fig. 3a), *Azotobacter* (Fig. 3b), *Desulfomicrobium* (Fig. 3d), *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Desulfovibrio* (Fig. 3), and *nifH* sequences in cluster Mgv-*nifH* (Fig. 3a.1). The *nifH*-like OTUs in the *Alpha*/*Betaproteobacteria* showed similarity to *nifH* genes of *Sinorhizobium*, *Plemorphomonas*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, and *Azospirillum* (Fig. 3a). Among the gammaproteobacterial and *Firmicutes nifH* types, the genera *Azotobacter* and *Heliobacterium* were predominantly found (Fig. 3b and c). Among the sulfate reducers and other anaerobes, *nifH* types of *Desulfovibrio*, *Desulfumicrobium*, and *Clostridium* (Fig. 3d) were dominant in the mangrove sediments.

Figure 3 also shows that the sequence types occurred in distinct abundance across the two mangroves. A clear example of differential incidence is provided by the OTUs of the *Alpha*/*Betaproteobacteria*. In the OilMgv samples, the alphaproteobacterial *nifH* gene type was prevalent, whereas the betaproteobacterial type dominated in the AntMgv.

Testing of the composition of libraries by UniFrac revealed that the diazotrophic communities at the six sampling sites differed significantly from each other ($P < 0.05$). Although branches are long, two clusters were observed (separated by high values in jack-knife clustering analysis), the first encompassing libraries derived from the oil-contaminated mangrove and the second encompassing those from the uncontaminated mangrove (Fig. 4).

DISCUSSION

Biological nitrogen fixation is a key ecosystem process, and its activity is influenced by the resident functional microbial community and environmental conditions (13, 32). In mangroves, the sediment offers an outstanding habitat in which nitrogen fixation can occur, the main reason being the oxygen gradient, including anaerobic conditions and the presence of carbonaceous and other nutrients (2, 22). Here, we addressed questions about the abundance and diversity of diazotrophic communities across sediment samples and the possible effect of oil pollution. We used the *nifH* gene as a proxy for the nitrogen-fixing communities involved.

A few previous studies have addressed the microbial diversity in mangroves, most of them reporting taxonomical groups inhabiting this ecosystem and assessing shifts in the community structures in the face of environmental pressures (9, 15, 23, 42). However, the composition and dynamics of the mangrove microbiome are still scarcely explored and understood in terms of its functional groups (2, 13, 15, 32). In our study, the qPCR data revealed statistically similar diazotrophic community abundances across the samples of the two mangroves. This suggests that the carrying

Downloaded from http://aem.asm.org/ on October 23, 2012 by University of Groningen

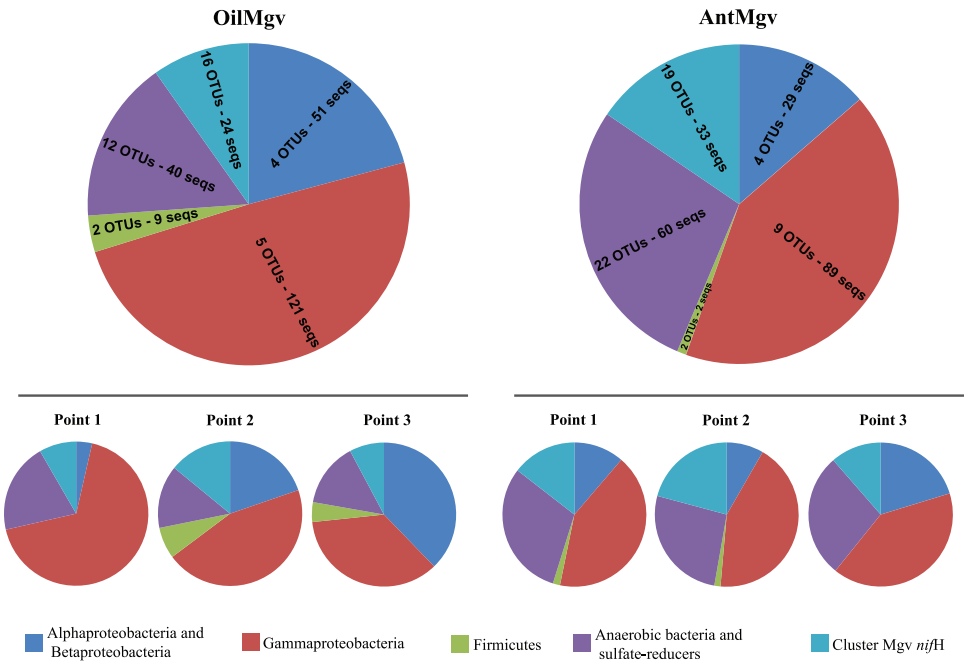


FIG 2 Taxonomic distribution of *nifH*-generated OTUs between each mangrove and among sites within mangroves. Sequences were clustered using a cutoff value of 80% similarity at the nucleotide level.

capacities for such microbial guilds were similar across the sediments sampled in the two transects. However, a trend toward an increased abundance in the area with higher oil impact (sites 2 and 3 within the oil-contaminated mangrove) was found. The oil contamination may have raised carbon input (see data for point 2 in Table 2) and limited O_2 availability at sites 2 and 3, stimulating these populations compared to site 1 (unpolluted) in this mangrove. In addition, the vegetation at sites 2 and 3 was less dense and diverse (Table 1), leading to less intense cycling of organic matter, thus inducing the growth of diazotrophs to obtain inorganic forms of nitrogen. Such indications were also made by metagenomics analyses in the same area, where higher densities of anaerobes were found in the oiled mangrove (2). These observations are also underlined by Li et al. (22), who defined mangroves as environments with particular nutrient cycling and site-specific anaerobic and aerobic conditions, where distinct microbially mediated transformations can occur. It also helps explain why induced organisms in the oiled area were not affiliated with the anaerobic sulfate-reducer organisms but were affiliated with other (*Alpha*/*Betaproteobacteria* and Mgv-*nifH*) groups, evidencing a possible role of growth inhibition promoted by the oil under the sulfate-reducer organisms, an issue that should be better assessed later by a function-based approach (for example, metatranscriptomics).

Regarding the diversity of the *nifH* gene sequences, the differences in the PCR-DGGE profiles between mangroves and among sites within a mangrove showed the responsiveness of the diazotrophic communities to environmental contamination with oil. The differences between the mangrove sites corroborate previous data where other fractions of microbial communities were revealed to be responsive to oil pollution in mangrove sediments (10, 36). This allowed us to pinpoint the key *nifH* gene types as candidates for biological indicators of mangrove contamination. Other microbial groups have also been selected for this purpose, as recently described for the fungal (13) and archaeal (10) communities in the same area.

From the clone library analyses, we learned which *nifH* groups have the ability to cope with prevailing mangrove conditions, such as fluctuating salinity and oxia/anoxia (19, 20). Considering the phylogenetic placement of the *nifH* gene sequences, the mangroves exhibited a suite of *nifH* types affiliated with phyla across the bacterial tree. The sequences were, in part, similar to those described for diazotrophs in the marine environment, but they were also similar to those found in anaerobic and aerobic soils. Strikingly, several sequences grouped separately from those found in databases, forming the so-called Mgv-*nifH* cluster. This finding certainly merits further studies, as it puts us on the track of potentially novel diazotrophic types that abound in mangrove ecosystems and have putative ecological roles in this habitat. Mangroves offer very particular conditions to their inhabitants (mixed influences from marine and terrestrial environments) and hence can be seen as reservoirs for such genetic and ecological novelty. Similar findings are described in the literature, where specific clusters were composed of sequences retrieved from mangroves sediments for the gene *dsrB* (37) and archaeal *amoA* (10).

Many members of the *Proteobacteria* have been described as nitrogen fixers in marine ecosystems. Bagwell et al. (3) reported a set of *nifH* gene sequences affiliated with the *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, and *Gammaproteobacteria* in oligotrophic tropical seagrass beds. Church et al. (6) detected *nifH* gene sequences identical to those previously described for an uncultivated gammaproteobacterial line in the north Pacific Ocean. Bird et al. (5) suggested that gammaproteobacterial nitrogen fixers are widespread and likely the most important component of the heterotrophic diazotrophic community of tropical and subtropical oceans. Together, these reports reinforce the role of *Proteobacte-*

Downloaded from http://aem.asm.org/ on October 23, 2012 by University of Groningen

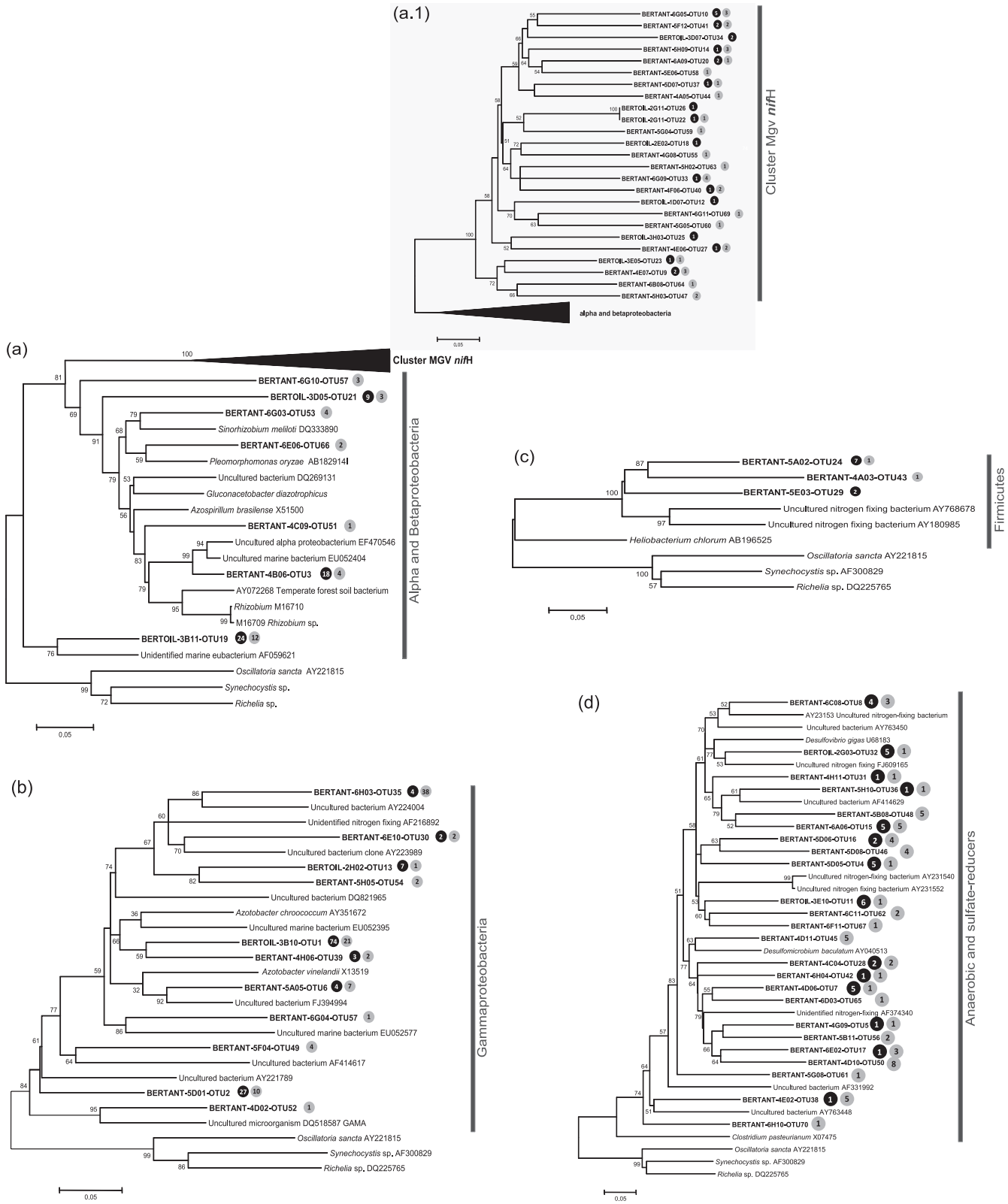


FIG 3 Phylogenetic analysis of *nifH* gene sequences retrieved from Bertioga mangroves. Bootstrap values (1,000 repetitions) above 50% are indicated next to the tree branches. Solid black and gray circles represent sequences retrieved from OilMgv and AntMgv, respectively. Trees display one representative sequence per OTU, and the total number of sequences within each OTU is numerically indicated in the circles. Shown are retrieved *nifH* sequences related to *Alpha/Betaproteobacteria* groups (a), *Gammaproteobacteria* (b), *Firmicutes* (c), and anaerobic and sulfate-reducing bacteria (d). Phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining method, and the evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method. There were a total of 416 nucleotide positions in the final data set, and the numbers of base substitutions per site are indicated in the scale bars.

Downloaded from http://aem.asm.org/ on October 23, 2012 by University of Groningen

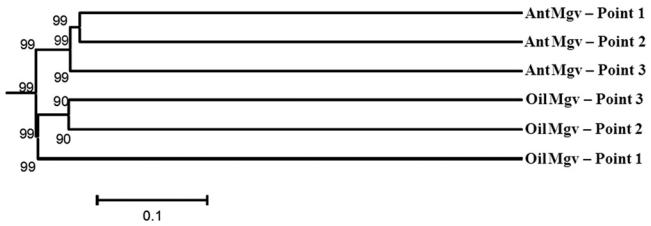


FIG 4 Dendrogram based on *nifH* gene clone libraries showing the differences in community structure at six sampling points. The distance matrices were generated with UNIFRAC and were used to group the points of the sediments analyzed using the unweighted-pair group method with arithmetic means, and jack-knife analysis was used to evaluate the robustness of each cluster related to the environment, size, and uniformity of the sample. The numbers indicate the frequency in the permutation test, which was supported by jack-knife analysis.

ria, in particular *Gammaproteobacteria*, as nitrogen fixers in marine ecosystems. This is consistent with the prominence of gammaproteobacterial *nifH* in our mangrove samples, particularly for the increase of such groups in the OilMgv.

Considering the contextual parameters that modulate the microbial assemblages in mangroves, physicochemical parameters and vegetation type stand out as the strongest agents. Here, parameters of nitrogen and sulfur contents, as well as pH values, were revealed to impose distinct conditions on the assemblage of *nifH* host communities. It can be suggested that these variables modulate specifically the activity of nitrogenase, possibly determining the essentiality of *nifH* presence in such communities. The contents of sulfur can play a role in supporting microbial metabolism (i.e., sulfate reduction) or exerting a toxic effect in specific microbial groups (in the form of H_2S). However, the better combination of those factors is still to be elucidated, possibly by the use of some function-based approach, such as metatranscriptomics analysis. Flores-Meireles et al. (14) found the rhizosphere of *Avicennia germinans* to be a selective environment for diazotrophic microorganisms, being essential to determine the structure of diazotrophic communities associated with mangrove roots.

The results reported in this study provide fundamental insights into the structure and diversity of major nitrogen-fixing bacterial populations in mangrove sediments, revealing clusters of novel sequences that are uniquely found in the mangrove ecosystem. We propose the use of this Mgv-*nifH* mangrove *nifH* type as a protoprobe for a thorough future investigation of the involvement of the underlying microbial group in the sediment nitrogen fixation process, which in our view is presumably a free-living group.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP; number 2004/13910-6). We also thank the Dutch NWO-ERGO program for funding, and A. C. F. Dias received a graduate fellowship from FAPESP (no. 2008/54013-8).

We thank João L. Silva for his help with the mangrove expeditions and sampling.

REFERENCES

1. **Alongi DM.** 1988. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. Microb. Ecol. **15**:59–79.
2. **Andreote FD, et al.** 2012. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. PLoS One **7**:e38600. doi:10.1371/journal.pone.0038600.
3. **Bagwell CE, et al.** 2002. Molecular diversity of diazotrophs in oligotrophic tropical seagrass bed communities. FEMS Microb. Ecol. **39**:113–119.
4. **Beman JM, Francis CA.** 2006. Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahia del Tobari, Mexico. Appl. Environ. Microbiol. **72**:7767–7777.
5. **Bird C, Martinez JM, O'Donnell AG, Wyman M.** 2005. Spatial distribution and transcriptional activity of an uncultured clade of planktonic diazotrophic γ-proteobacteria in the Arabian Sea. Appl. Environ. Microbiol. **71**:2079–2085.
6. **Church MJ, Short CM, Jenkins BD, Karl DM, Zehr JP.** 2005. Temporal patterns of nitrogenase gene (*nifH*) expression in the oligotrophic North Pacific Ocean. Appl. Environ. Microbiol. **71**:5362–5370.
7. **Clarke K, Gorley R.** 2006. PRIMER v6: user manual/tutorial. Primer-E Ltd, Plymouth, United Kingdom.
8. **Diallo MD, et al.** 2004. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N_2-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. Environ. Microbiol. **6**:400–415.
9. **Dias ACF, et al.** 2010. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. Antonie van Leeuwenhoek **98**:541–551.
10. **Dias ACF, et al.** 2011. Archaeal communities in sediments of three contrasting mangroves. J. Soils Sediments **11**:1466–1476.
11. **Dos Santos H, et al.** 2011. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. PLoS One **6**:e16943. doi:10.1371/journal.pone.0016943.
12. **Duke NC, Meynecke JO, Dittmann S.** 2007. A world without mangroves? Science **317**:41–42.
13. **Fasanella CC, et al.** 2012. The selection exerted by oil contamination on mangrove fungal communities. Water Air Soil Pollut. **223**:4233–4243.
14. **Flores-Mireles AL, Winans SC, Holguin G.** 2007. Molecular characterization of diazotrophic and denitrifying bacteria associated with mangrove roots. Appl. Environ. Microbiol. **73**:7308–7321.
15. **Gomes NCM, et al.** 2008. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. FEMS Microbiol. Ecol. **66**: 96–109.
16. **Gomes NC, et al.** 2010. Mangrove microniches determine the structural and functional diversity of enriched petroleum hydrocarbon-degrading consortia. FEMS Microbiol. Ecol. **74**:276–290.
17. **Holguin GB, et al.** 1999. La microbiología de los manglares. Bosques en la frontera entre el mar y la tierra. Ciencia Desarrollo **25**:26–35.
18. **Holguin G, Vazquez P, Bashan Y.** 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. Biol. Fertil. Soils **33**:265–278.
19. **Holguin G, et al.** 2006. Mangrove health in an arid environment encroached by urban development—a case study. Sci. Total Environ. **363**: 260–274.
20. **Kathiresan K, Bingham BL.** 2001. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. Adv. Mar. Biol. **40**:81–251.
21. **Kristensen E, et al.** 1998. Transformation and transport of inorganic nitrogen in sediments of a southeast Asian mangrove forest. Aquat. Microb. Ecol. **15**:165–175.
22. **Li M, Cao H, Hong Y, Gu JD.** 2011. Spatial distribution and abundances of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in mangrove sediments. Appl. Microbiol. Biotechnol. **89**:1243–1254.
23. **Liang JB, et al.** 2007. Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. Mar. Biol. **150**:739–747.
24. **Lovell CR, Friez MJ, Longshore JW, Bagwell CE.** 2001. Recovery and phylogenetic analysis of *nifH* sequences from diazotrophic bacteria associated with dead aboveground biomass of *Spartina alterniflora.* Appl. Environ. Microbiol. **67**:5308–5314.
25. **Mehta MP, Butterfield DA, Baross JA.** 2003. Phylogenetic diversity of nitrogenase (*nifH*) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca Ridge. Appl. Environ. Microbiol. **69**:960–970.
26. **Patra AK, et al.** 2006. Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. Environ. Microbiol. **8**:1005–1016.
27. **Pereira e Silva MC, Semenov AV, van Elsas JD, Salles JF.** 2011. Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. FEMS Microbiol. Ecol. **77**:57–68.
28. **Poly F, Monrozier LJ, Bally R.** 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. Res. Microbiol. **152**:95–103.

Downloaded from http://aem.asm.org/ on October 23, 2012 by University of Groningen

29. **Raymond J, Siefert JL, Staples CR, Blankenship RE.** 2004. The natural history of nitrogen fixation. Mol. Biol. Evol. **21**:541–554.
30. **Rosch C, Bothe H.** 2009. Diversity of total, nitrogen-fixing and denitrifying bacteria in an acid forest soil. Eur. J. Soil Sci. **60**:883–894.
31. **Saitou N, Nei M.** 1987. The neighbor-joining method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4**:406–425.
32. **Santos HF, Carmo FL, Paes JE, Rosado AS, Peixoto RS.** 2011. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. Water Air Soil Pollut. **216**:329–350.
33. **Schaeffer-Novelli Y, Cintron-Molero G, Adaime RR, Camargo TM.** 1990. Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian coast. Estuaries **13**:204–218.
34. **Schloss PD, et al.** 2009. Introducing MOTHUR: open-source, platform-independent, community supported software for describing and comparing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. **75**:537–7541.
35. **Simonet P, et al.** 1991. Frankia genus-specific characterization by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. **57**:3278–3286.
36. **Taketani RG, dos Santos HF, van Elsas JD, Rosado AS.** 2009. Characterization of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. Antonie van Leeuwenhoek **96**:343–354.
37. **Taketani RG, Yoshiura CA, Dias ACF, Andreote FD, Tsai SM.** 2010. Diversity and identification of methanogenic archaea and sulphate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. Antonie van Leeuwenhoek **97**:401–411.
38. **Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. **24**:1596–1599.
39. **Turk KA, et al.** 2011. Nitrogen fixation and nitrogenase (*nifH*) expression in tropical waters of the eastern North Atlantic. ISME J. **5**:120–1212.
39a. **Van Raij B, Cantarella H, Andrade JC, Quaggio JA.** 2001. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Instituto Agronômico, Campinas, Brazil. (In Portuguese.)
40. **Vlaeminck SE, Hay AG, Maignien L, Verstraete W.** 2011. In quest of the nitrogen oxidizing prokaryotes of the early Earth. Environ. Microbiol. **13**:283–295.
41. **Zehr JP, McReynolds LA.** 1989. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. Appl. Environ. Microbiol. **55**:2522–2526.
42. **Zhou HW, Luanc TG, Zoub F, Tam NFY.** 2008. Different bacterial groups for biodegradation of three- and four-ring PAHs isolated from a Hong Kong mangrove sediment. J. Hazard. Mater. **152**:1179–1185.

Downloaded from http://aem.asm.org/ on October 23, 2012 by University of Groningen