

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR  
MESTRADO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

**GEÓRGIA BARGUIL COLARES**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA DE COMUNIDADES MICROBIANAS  
ASSOCIADAS À RIZOSFERA DE *Rhizophora mangle* DO  
MANGUEZAL DO RIO PACOTI, ZONA LESTE DA COSTA  
CEARENSE**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. VÂNIA MARIA MACIEL MELO**

FORTALEZA - CE  
2010

Geórgia Barguil Colares

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA DE COMUNIDADES MICROBIANAS  
ASSOCIADAS À RIZOSFERA DE *RHIZOPHORA MANGLE* DO  
MANGUEZAL DO RIO PACOTI, ZONA LESTE DA COSTA  
CEARENSE**

Dissertação submetida à Coordenação do  
Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências  
do Mar da Universidade Federal do Ceará,  
como requisito parcial para obtenção do  
grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria  
Maciel Melo

FORTALEZA  
2010

C649 Colares, Geórgia Barguil

Diversidade e estrutura de comunidades microbianas associadas à rizosfera de \*rhizophora mangle\* do manguezal do rio pacoti, zona leste da costa cearense / Geórgia Barguil Colares. 2010.  
60 f.; il. color. enc.

Orientadora: Dra. Vânia Maria Maciel Melo

Área de concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Instituto de ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2010.

1. Manguezal 2. Rio Pacoti 3. solo 4. diversidade microbiana 5. rDNA 16S 6. DGGE I. Melo, Vânia Maria Maciel (Orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Curso de Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais III. Título

CDD 571.629

GEÓRGIA BARGUIL COLARES

DIVERSIDADE E ESTRUTURA DE COMUNIDADES MICROBIANAS ASSOCIADAS À  
RIZOSFERA DE *Rhizophora mangle* DO MANGUEZAL DO RIO PACOTI, ZONA LESTE  
DA COSTA CEARENSE

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas  
Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau  
de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais Área de concentração Utilização e Manejo de  
Ecossistemas Marinhos e Estuarinos

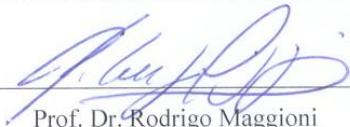
Aprovada em: 22/01/2010

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Vânia Maria Maciel Melo (Orientador)

Universidade Federal do Ceará-UFC



Prof. Dr. Rodrigo Maggioni

Universidade Federal do Ceará-UFC



Prof. Dra. Dulcecléide Bezerra de Freitas

Universidade Estadual do Piauí - UESPI

**A meus pais, *Neila e Ítalo*,  
dedico com amor.**

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Vânia Melo, pela confiança, apoio, muitas valiosas sugestões, tanto para a minha vida profissional quanto pessoal, e pelo exemplo como professora, orientadora e pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Maggioni, por ter aceitado fazer parte da banca de avaliação deste trabalho e também pelas aulas muito proveitosas, apesar da minha constante ausência, da disciplina de Genética Molecular de Organismos Marinhos.

À Profa. Dra. Dulce Bezerra por ter aceitado fazer parte da banca de avaliação deste trabalho e por ter me ensinado a fazer minhas primeiras PCRs e eletroforeses. Sua contribuição na minha formação foi fundamental.

À Profa. Dra. Ana de Fátima Urano e à equipe do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais por disponibilizar o laboratório, reagentes e equipamentos sempre que foi preciso.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, do Laboratório de Citogenética e Genética Molecular, por ter permitido o uso do seu fotodocumentador para a captura de imagens dos géis.

Ao Prof. Dr. George Satander e à equipe do Laboratório de Geologia Marinha e Aplicada por ter disponibilizado o laboratório para a realização de algumas das análises granulométricas deste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, aos antigos, aos novos, aos “agregados” e aos que foram seguir outros caminhos: Alysson Lira, Andréa Oliveira, Bárbara Soares, Caio Leão, Denise Hissa, Dulce Bezerra, Elis Alencar, Fernanda Paes, Glauber Melo, Júlio Ximenes, Kizeane Fajardo, Laís Feitosa, Lidianne Leal, Lilian Pâmela, Luína Benevides, Manu Rabelo, Natália Falcão, Natasha Wanderley, Raphaela Gomes, Tallita Tavares, Tecia Vieira, Vanessa Câmara, Vanessa Nogueira, Wal Melgaço e Yuri Sampaio. Incrível como cada um de vocês me ajudou em algum momento deste trabalho, seja na execução ou na simples força de um “vai dar certo, Geórgia!”. Muito obrigada!

Ao “seu” Valdenor de Oliveira pelo cuidado e zelo com o nosso tão querido bloco 909 e pela simpatia que sempre alegrou meus dias.

À Lili Ribeiro pela ajuda sempre que precisei.

Aos amigos da turma de Ciências Biológicas 2003.1 e “agregados” pela

presença ainda constante em minha vida, pelas saídas e festinhas sempre muito animadas.

Aos meus colegas da turma de mestrado de 2008, em especial a Elthon Gois, Hortência Barroso e Tallita Tavares pela amizade neste período tão enriquecedor da minha vida.

A Paulo Thieres por ter me ajudado em todas as etapas deste trabalho e pelo constante apoio, carinho e compreensão, mesmo tendo que sacrificar nosso natal e ano-novo para que eu pudesse escrever este trabalho à tempo. Muito obrigada, meu amor!

Aos meus pais pelo incansável e incondicional apoio, mesmo sem muitas vezes entender as minhas escolhas e rumos. Amo vocês também incansável e incondicionalmente!

Ao Instituto de Ciências do Mar – Labomar, seus professores e funcionários, por esses preciosos 2 anos de mestrado.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, ajudaram na execução deste trabalho.

**“Sonho que se sonha só é só um  
sonho que se sonha só. Sonho que se  
sonha junto é realidade.”**

**Raul Seixas**



## RESUMO

Os manguezais são ecossistemas costeiros que ocorrem em regiões de clima tropical e subtropical, sujeitos a ação das marés. São regiões de extrema importância para a reprodução de espécies, atuam como aparadores da linha da costa e possuem espécies vegetais endêmicas, conhecidas como mangue. Os manguezais geralmente são áreas bastante populosas, estando sujeitos a diversos impactos antrópicos, como a descarga de esgotos não-tratados, o desmatamento das espécies vegetais e assoreamento dos rios. Esses impactos afetam as populações de animais, vegetais e de micro-organismos habitantes dessas áreas, acarretando uma perda de diversidade desses organismos. Os micro-organismos do solo dos manguezais representam uma considerável parcela das atividades de ciclagem de nutrientes e decomposição de detritos, tendo fundamental importância para o equilíbrio dos ecossistemas. Entretanto, estudos de diversidade e estrutura dessas comunidades de micro-organismos em solos de manguezais são ainda escassos pela dificuldade de cultivo desses seres em laboratório. Com o avanço da biologia molecular, suas técnicas de estudo de diversidade utilizando o gene do rRNA 16S, houve a oportunidade de se estudar comunidades microbianas que não seriam acessadas por métodos de cultivos tradicionais. Deste modo, este estudo visa investigar a estrutura e a diversidade das comunidades microbianas do solo da rizosfera de *Rhizophora mangle* do manguezal do Rio Pacoti, localizado na região metropolitana de Fortaleza, através da técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE), assim podendo obter perfis de diversidade e caracterizar as comunidades microbianas habitantes do manguezal, comparando os dados obtidos com as variáveis ambientais e características do solo. Os resultados mostraram que as comunidades microbianas de solos do manguezal são semelhantes em número de UTOs, mas diferem em composição. As variáveis físico-químicas e as características do solo são responsáveis pelas diferenças na composição e estrutura das comunidades microbianas, apesar de que o efeito rizosférico determina a ocorrência de muitas UTOs em comum entre os diferentes pontos de coleta. As análises de diversidade das comunidades mostraram que estas estão em equilíbrio por não haver dominância de UTOs e por apresentarem similaridades entre os pontos e períodos analisados. Em conclusão, os solos da rizosfera de *Rhizophora mangle* do manguezal do Rio Pacoti abrigam comunidades microbianas diversas, em equilíbrio, que diferem em estrutura e composição.

Palavras-chave: manguezal, Rio Pacoti, solo, diversidade microbiana, rDNA 16S, DGGE.

## ABSTRACT

Mangroves are coastal ecosystems which occur in tropical and subtropical regions, subjected to tidal action. These ecosystems are very important for species reproduction and act as shoreline protectors. Mangroves are usually highly populated areas and are exposed to various human impacts, such as the discharge of untreated sewage, deforestation and river silting. These impacts affect populations of animals, plants and microorganisms that inhabit these areas, causing a loss of diversity. The mangrove soil microorganisms represent a considerable portion of the activities of nutrient cycling and decomposition of waste with a fundamental importance for the ecosystem balance. However, studies focusing on the diversity and structure of microorganism communities in mangroves soils are still limited by cultivation techniques. With the advance of the molecular biology techniques, using the gene encoding the 16S subunit of the ribosomal RNA, the study of microbial communities that would not be accessed by traditional methods of cultivation was enabled. Thus, this study aims to investigate the structure and diversity of soil microbial communities from the rhizosphere of *Rhizophora mangle* from the Pacoti River, located in the metropolitan region of Fortaleza, using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), obtaining diversity profiles and characterizing the mangrove microbial communities and to compare it to the data obtained from the environmental variables and soil characteristics. Results showed that the mangrove soils microbial communities are similar in number of OTUs, but differ in composition. The physical and chemical variables and soil characteristics are responsible for the differences in the microbial communities' composition and structure, although the rhizosphere effect determines the occurrence of various OTUs in common among the sampling sites. The communities' diversity analysis showed that they are in balance due to the fact that there is no dominance of OTUs and the communities present spatial and temporal similarities. In conclusion, the *Rhizophora mangle* rhizosphere soils of the Pacoti River mangrove harbor diverse and stable microbial communities that differ in structure and in composition.

Keywords: mangrove, Pacoti River, soil, microbial diversity, rDNA 16S, DGGE.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Desenho esquemático apontando como se organizam os componentes orgânicos e inorgânicos do solo .....	19
Figura 2.	Árvore filogenética dos três domínios <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> e <i>Eucaryota</i> ....	21
Figura 3.	Esquema indicando as etapas de realização de estudos de comunidades microbianas do solo pela técnica de DGGE .....	25
Figura 4.	Impactos sofridos na área do Manguezal do rio Pacoti. A – Empreendimentos imobiliários às margens do rio, B –Assoreamento na foz do Rio Pacoti .....	27
Figura 5.	Procedimento de coleta do solo, mostrando a retirada do solo com o amostrador de PVC e acondicionamento das amostras em frascos estéreis .....	28
Figura 6.	Localização dos pontos de coleta no manguezal do Rio Pacoti – CE ....	29
Figura 7.	Agrupamento com base na matriz de distância euclidiana para fatores abióticos dos pontos (1, 2 e 3) e períodos (seco e chuvoso) de amostragem do solo do manguezal do Rio Pacoti – CE .....	34
Figura 8.	Agrupamentos hierárquicos com base nas distância de Jaccard e no algoritmo UPGMA e Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS) definidos a partir dos padrões de bandas obtidos por DGGE para <i>Bacteria</i> (A) e <i>Archaea</i> (B) nos pontos e períodos amostrados .....	35
Figura 9.	Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) detectadas com a técnica de DGGE e Diagramas de Venn baseado nas UTOs para os grupos <i>Bacteria</i> (A) e <i>Archaea</i> (B) .....	37
Figura 10.	Análise de Componentes Principais das comunidades de <i>Bacteria</i> (A) e <i>Archaea</i> (B) dos solos estudados .....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Variáveis ambientais dos pontos e períodos de coleta e características gerais dos solos .....	33
Tabela 2.	Índices de diversidade para as comunidades de <i>Bacteria</i> de amostras de solos do manguezal do Rio Pacoti, CE ....	38
Tabela 3.	Índices de diversidade para as comunidades de <i>Archaea</i> de amostras de solos do manguezal do Rio Pacoti, CE ....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

APA	Área de Proteção Ambiental
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DGGE	Eleforese em Gel de Gradiente Desnaturante
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
H'	Índice de Diversidade de Shannon
LemBiotech	Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia
M.O.	Matéria Orgânica
NMDS	Escalonamento Multidimensional não-métrico
RMF	Região Metropolitana de Fortaleza
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossomal
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVC	Policloreto de Vinila
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
T-RFLP	Polimorfismo do Comprimento de Restrição Terminal
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UFC	Universidade Federal do Ceará
UPGMA	Associação Média Não Ponderada
UTO	Unidade Taxonômica Operacional

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1.	Manguezais: aspectos gerais .....	16
2.2.	Micro-organismos e solo .....	19
2.3.	Diversidade de micro-organismos .....	21
2.4.	Métodos de estudo de micro-organismos .....	22
3.	OBJETIVOS .....	26
3.1.	Objetivo Geral .....	26
3.2.	Objetivos Específicos .....	26
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	27
4.1.	Área de Estudo .....	27
4.2.	Coleta .....	28
4.3.	Análises granulométricas .....	29
4.4.	Teor de matéria orgânica .....	30
4.5.	Extração de DNA .....	30
4.6.	PCR – DGGE .....	30
4.7.	Análise dos dados .....	32
5.	RESULTADOS .....	33
5.1.	Variáveis ambientais e características do solo .....	33
5.2.	Análise dos padrões de bandas gerados por DGGE .....	35
5.3.	Índices de diversidade de Unidades Taxonômicas Operacionais .....	37
5.4.	Relação das comunidades microbianas com as variáveis ambientais e características do solo .....	39
6.	DISCUSSÃO .....	41
7.	CONCLUSÃO .....	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

O manguezal é um ecossistema costeiro de transição entre os ambientes terrestre e marinho, característico de regiões tropicais e subtropicais e sujeito ao regime das marés. Ocorre em regiões litorâneas abrigadas como estuários, baías e lagunas, e apresenta condições propícias para alimentação, proteção e reprodução para muitas espécies animais, sendo considerado importante transformador de nutrientes em matéria orgânica e gerador de bens e serviços (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

Assentamentos urbanos e o desenvolvimento de atividades industriais, portuárias, pesqueiras, de exploração mineral, turísticas, entre outras, sem planejamento adequado, vem colocando em risco os atributos básicos dos estuários brasileiros e ecossistemas associados, resultando na diminuição da qualidade de vida da população local (SCHAEFFER-NOVELLI, 1989a). Os micro-organismos encontrados em manguezais, que possuem papel fundamental nas transformações bioquímicas de nutrientes e são essenciais para degradação da matéria orgânica e poluentes (URAKAWA *et al.*, 2000), são especialmente afetados por esses impactos, provocando alterações no equilíbrio e saúde do ecossistema.

Embora os micro-organismos desempenhem papéis cruciais na manutenção dos ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos, pouco se sabe sobre a diversidade e estrutura das comunidades microbianas de manguezais (GOMES *et al.*, 2008).

Na realidade, estima-se que se conheça menos de 1% dos micro-organismos existentes no planeta (HUGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998). Isso se deve às limitações impostas pelos métodos tradicionais de estudo, dependentes de cultivo. A metagenoma, uma abordagem molecular que faz uso do isolamento e caracterização do DNA total de uma amostra, sem necessidade de cultivá-la, tem possibilitado conhecer a real diversidade dos micro-organismos na natureza (HANDELSMAN, 2004).

Uma das técnicas moleculares utilizada para estudos de metagenômica vem a ser a de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) que é baseada na separação de produtos de PCR de mesmo tamanho, porém com composição nucleotídica diferente. Com esta técnica é possível obter perfis de comunidades microbianas e identificar diferenças espaciais e temporais em comunidades microbianas, tornando também possível conhecer a sua diversidade e estrutura (NAKATSU, 2007).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi explorar a diversidade estrutural das comunidades microbianas habitantes do solo superficial da rizosfera de *Rhizophora mangle* do manguezal do Rio Pacoti, CE, realizar comparações espaciais e temporais e compreender as interações ecológicas entre os micro-organismos e os fatores ambientais que determinam sua riqueza e abundância.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Manguezais: aspectos gerais

Os manguezais são ecossistemas costeiros encontrados em regiões tropicais e subtropicais do planeta, cobrindo uma área 18.107.700 ha dos quais 18,7% estão nas Américas (SPALDING; BLASCO; FIELD, 1997).

No Brasil está a segunda maior área de manguezal do mundo e a maior do continente, distribuídos ao longo de aproximadamente 6.800 km de costa (KJERFVE; LACERDA, 1993), desde o rio Oiapoque, na divisa do Amapá com a Guiana Francesa (04°30'N), até a praia do Sonho, em Santa Catarina (28°53'S) (SCHAEFFER-NOVELLI, 1989b) totalizando quase 1.300.000 ha de manguezal (SPALDING; BLASCO; FIELD 1997).

Os manguezais estão tipicamente localizados em zonas de transição entre os ecossistemas terrestres, marinhos e dulcícolas. A zona costeira tropical é uma das regiões mais ativas na biosfera em termos de biogeoquímica, representando um importante depósito de fontes de carbono. Florestas de manguezais são interfaces importantes na troca de sedimentos, matéria orgânica e gases entre o ecossistema terrestre, a atmosfera e os oceanos (ALONGI *et al.*, 2004)

Segundo Schaeffer-Novelli e Cintrón (1990) os manguezais apresentam uma zonação em relação à duração da imersão e à salinidade de água. A camada externa do manguezal é formada em sua maior parte por *Rhizophora mangle* (mangue vermelho), em menor proporção encontra-se a *Avicennia schaueriana* (mangue preto ou siriúba) e *Languncularia racemosa* (mangue branco). A vegetação de transição com a terra firme é formada por *Conocarpus erectus* (mangue botão).

O termo “mangue” é usado geralmente para designar espécies vegetais que crescem em planícies costeiras inundadas pela ação das marés. Uma dessas espécies, a *Rhizophora mangle*, prefere solos com a salinidade próxima a do mar e está restrita a ambientes costeiros, particularmente aqueles com baixa energia, protegidos, localizados em áreas entremarés e com altas concentrações de silte. (STERN; VOIGT 1959, MORROW; NICKERSON, 1973). A característica mais marcante dessa espécie vegetal são as estruturas que saem do caule e formam grandes galhos para a fixação da planta no substrato inconsolidado do manguezal. Essas estruturas de sustentação fazem trocas gasosas (por lenticelas) para o sistema de raízes no subsolo (GILL; TOMLINSON, 1972).

Hipóteses a respeito dos fatores ambientais que controlam o padrão de distribuição

das espécies de mangue postulam que diferentes espécies são capazes de se estabilizar e crescer bem somente sob condições ambientais restritas. Por exemplo, a adaptação fisiológica de uma espécie à frequência e à duração da inundação pela maré é comumente citada como o principal mecanismo que controla o padrão espacial da vegetação do manguezal. O padrão de distribuição também tem sido correlacionado com a salinidade da água que percola o solo. (MACNAE, 1968; CLARKE; HANNON, 1970; LOPEZ-PORTILLO; EZCURRA, 1989), potencial redox do solo (MCKEE, 1993), concentração de sulfido da água (NICKERSON; THIBODEAU, 1985; MCKEE, 1993), textura do solo (CLARKE; ALLAWAY, 1993), e disponibilidade de nutrientes no solo (BOTO; WELLINGTON, 1984).

Árvores de manguezal dominam o fluxo de carbono e nitrogênio, estando entre as espécies vegetais mais produtivas (ALONGI, 2002). Apesar dessa alta produtividade, a maior parte do carbono fixado parece ficar retida no próprio ecossistema (TWILLEY, 1988). O nitrogênio também parece ser assimilado e retido devido possivelmente à evolução de vários mecanismos de conservação. As árvores e consórcios microbianos constituem um elo energético juntamente com os caranguejos, que como uma espécie fundamental, bioturba os sedimentos, tornando-o um abrigo para o crescimento microbiano e melhora a condição do solo para o crescimento das espécies vegetais. (KRISTENSEN *et al.*, 1995; ALONGI *et al.*, 2002).

Acima da linha d'água as árvores de manguezal fornecem habitat para uma grande diversidade de espécies, nas quais estão incluídas aves, insetos, mamíferos e répteis. Abaixo da água, as raízes de mangue são colonizadas por epibiontes tais como tunicados, esponjas, algas e bivalves. O substrato inconsolidado do manguezal torna-se habitat para várias espécies epi e infaunais, enquanto o espaço entre as raízes fornece abrigo e alimento para a fauna móvel como siris, caranguejos e peixes (SASEKUMAR, 1974).

A vegetação de mangue contribui para a complexidade deste habitat e de sua fauna associada (HUTCHINGS; SAENGER, 1987; LEE, 1998). A macrofauna dominante em termos de abundância e diversidade é representada por crustáceos e moluscos (SASEKUMAR, 1974; JONES, 1984). Essa macrofauna forma um importante elo entre os detritos que formam a base da teia alimentar do manguezal e dos consumidores em níveis tróficos mais altos, que incluem aves e espécies comerciais de peixes (MACINTOSH, 1984). A macrofauna também é responsável por modificar a estrutura física e da vegetação do manguezal pela atividade de escavação (SMITH *et al.*, 1991) e por se alimentarem de propágulos, folhas e madeira (BERRY, 1972; SMITH, 1987). De modo geral, crustáceos e moluscos desempenham importante papel no funcionamento dos ecossistemas de manguezais (LEE, 1999).

Apesar da baixa diversidade de espécies de plantas e estrutura relativamente simples, o ecossistema manguezal contribui para funções ecológicas complexas como proteção da costa, berçário e local de alimentação de muitas espécies da fauna. (ODUM; HEALD, 1972; BURNS, 1977; RODRIGUEZ, 1987; ROBERTSON; DUKE, 1987). Deste modo, a produtividade e a biodiversidade de ecossistemas adjacentes dependem, de alguma forma, da integridade das florestas de manguezais.

Frequentemente localizadas em áreas urbanas, as florestas de mangue são importantes habitats especialmente em países em desenvolvimento e têm importante papel na subsistência humana, sendo explorado principalmente pela pesca e coleta de crustáceos e moluscos (ALONGI, 2002), também sendo tradicionalmente muito usadas para extração de madeira, combustível e medicamentos (SAENGER, 2002). Por este fato, estão sujeitas a impactos antrópicos constantes que são a principal causa de deterioração desses ecossistemas e, de acordo com Duke e colaboradores (2007), os manguezais estão em processo de desaparecimento em todo o mundo.

Nos últimos 50 anos, um terço das florestas de manguezais do mundo foi perdida para o desenvolvimento de áreas urbanas na costa (ALONGI, 2002). Como exemplo, estima-se que a Malásia chegou a perder 17% da sua área de manguezal entre 1965 e 1985, na Índia 50% entre 1963 e 1977, e nas Filipinas 70% entre 1920 e 1990 (WORLD RESOURCES INSTITUTE, 1996). Muitos outros países na Ásia, América Latina e África perderam de 30 a 70% nos últimos 40 anos (WORLD RESOURCES INSTITUTE, 1996; SPALDING; BLASCO; FIELD, 1997).

No Brasil, os manguezais são considerados pela legislação federal como áreas de preservação permanente (CONAMA, 2002). Apesar disso, o ecossistema está constantemente ameaçado por uma série de atividades humanas que são desenvolvidas tanto ao longo da costa como no interior e são distribuídas pelas bacias hidrográficas dos rios. As áreas de manguezal no Brasil vêm sofrendo mudanças ocasionadas, direta e indiretamente, por atividades antropogênicas associadas à expansão urbana como a construção de portos, turismo e a agricultura, especialmente na costa do nordeste e sudeste (VANNUCCI, 2002) onde também alguns processos de erosão podem ser observados em algumas áreas. (SOUZA FILHO; MARTINS; COSTA, 2006).

Mais especificamente na costa do nordeste brasileiro, a qual se caracteriza por ser um setor semi-árido do litoral do país, políticas para amenizar os efeitos da seca têm resultado em mudanças ambientais intensas. As construções de barragens para irrigação e usos na

agricultura resultaram no decréscimo de água doce disponível para a zona costeira. Mais recentemente o desenvolvimento acelerado do turismo e da carnicultura também tem contribuído para as mudanças significativas na linha da costa. Erosão, aumento na entrada de água salgada e crescimento na formação de bancos de areia levados pelo vento, resultaram em mudanças significativas na cobertura do mangue pela costa nordeste do Brasil (LACERDA; MARINS, 2002).

Os impactos severos nos manguezais, ocasionados pelo crescimento contínuo das áreas urbanas, modificam seus regimes hidrológicos e sedimentológicos como também a dinâmica de nutrientes e poluentes químicos (LEE *et al.*, 2006). O constante impacto ao qual os manguezais estão submetidos afeta, em particular, as comunidades microbianas presentes nos solos de manguezal, as quais são cruciais para a saúde e balanço desse ecossistema (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

## 2.2. Micro-organismos e solo

Os solos são sistemas complexos de componentes vivos e não-vivos. Os componentes vivos abrangem raízes de plantas, bem como populações de micro-organismos e animais. A porção não-viva do solo inclui água, matéria orgânica, fragmentos de rocha de tamanhos variados, desde as partículas grandes as areias que tem grandes poros que acumulam ar, mas poucos nutrientes e água, até as menores, as argilas, que tem pouco ar, mas muitos nutrientes e água (Fig. 1) (VORONEY, 2007).

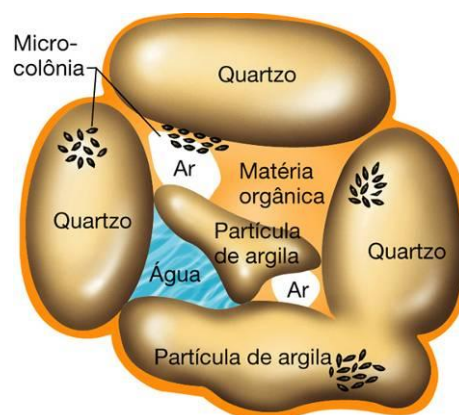


Figura 1: Desenho esquemático apontando como se organizam os componentes orgânicos e inorgânicos do solo (adaptado de PURVES *et al.*, 2002)

A estrutura dos solos modifica-se com a profundidade, revelando um perfil de

solo. Três horizontes principais (A, B e C) são reconhecidos em um perfil de solo típico. O horizonte A é a camada superior do solo de onde podem ser retirados nutrientes minerais por lixiviação. A maior parte da matéria orgânica do solo localiza-se no horizonte A, onde está a maioria dos organismos vivos. O horizonte B ou subsolo é a zona de infiltração e de acumulação dos materiais provenientes do horizonte superior, o horizonte C é a rocha mãe original, da qual deriva o solo (VORONEY, 2007). Nos manguezais não há um perfil de solo típico, podendo apresentar perfis diversos (ALONGI, 2009).

Chuvas, temperaturas extremas e atividades de plantas e animais e atividades humanas, como a agricultura, interagem de modo a causar constantes mudanças no solo. Esses fatores, juntamente com as características inerentes de determinados espaços geográficos com condições ambientais similares e comunidades de plantas características evoluíram tornando-se os atuais biomas terrestres e seus solos associados (VORONEY, 2007).

A microbiota do solo desempenha funções centrais para processos de decomposição e ciclagem de nutrientes. Os solos são considerados depósitos de atividade microbiana, apesar de o espaço ocupado por micro-organismos vivos ser estimado em menos de 5% do espaço total. Portanto, a predominância de atividade microbiana é encontrada em “*hot spots*”, como por exemplo, agregados com matéria orgânica acumulada e a rizosfera. (LYNCH, 1990; PINTON; VARANINI; NANNIPIERI, 2001)

Ecologistas microbianos têm estudado a composição da comunidade microbiana por esta controlar vários processos que ocorrem no solo (CAVIGELLI; ROBERTSON, 2000; BAKKER *et al.*, 2002). A diversidade e a estrutura de microrganismos na rizosfera são influenciadas pelo tipo de planta e de solo (LATOUR *et al.*, 1996).

Micro-organismos de solo e os processos associados a eles estão integralmente envolvidos no funcionamento dos ecossistemas terrestres (OGUNSEITAN, 2005). Entender os fatores cruciais envolvidos na distribuição e função das espécies microbianas é de grande importância. O tipo de solo parece ser o fator primário em determinar a composição das espécies microbianas e/ou sua função (BOSSIO *et al.*, 1998; BUYER; ROBERTS; RUSSEK-COHEN, 1999; GELSOMINO *et al.*, 1999; GIRVAN *et al.*, 2003; RASCHE *et al.*, 2006). A variação de fatores físico-químicos e ambientais entre diferentes tipos de solo vai interagir de um modo complexo para influenciar a diversidade microbiana e sua função.

Há ampla evidência para propor uma íntima relação entre microrganismos - nutriente - planta que funciona como um mecanismo para reciclar e conservar nutrientes nesse ecossistema. A comunidade microbiana diversa e altamente produtiva vivendo em

manguezais tropicais transforma continuamente nutrientes de vegetação morta em fontes de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes que podem ser usados pelas plantas. Em troca, exudatos de raízes servem com fonte de nutrientes para os micro-organismos (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

Bactérias colonizadoras de rizosfera possuem um eficiente metabolismo para assimilar os compostos orgânicos presentes em exudatos das raízes (BARRAQUIO, 2000). Deste modo, a importância do estudo desses grupos de micro-organismos habitantes da rizosfera é a elucidação de diversos processos que ocorrem em ambientes naturais.

### 2.3. Diversidade de micro-organismos

Essencialmente com base na comparação de sequências de RNA ribossômico, Woese e colaboradores (1990) concluíram que os procariontes não eram um grupo coeso do ponto de vista evolutivo, mas composto por dois subgrupos principais, diferindo entre si e dos eucariontes. Esta diversidade evolutiva reflete-se no genoma e, por sua vez, na bioquímica e na ecologia.

Assim, propuseram a substituição da divisão do mundo vivo em dois grandes domínios (procariontes e eucariontes) por uma subdivisão em três domínios (Fig. 2): mantiveram os tradicionais eucariontes como o domínio *Eucaryota*, mas em vez dos tradicionais procariontes surgem os domínios *Archaea* e *Bacteria*, ao mesmo nível que os *Eucaryota*. A sua classificação tem por base a ideia de que a árvore da Vida tem três e não apenas dois ramos, sendo o ramo mais basal o que conduz ao domínio *Bacteria*, sendo posterior a ramificação dos dois restantes grupos, o que os torna mais relacionados entre si do que cada um deles com as bactérias (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990).

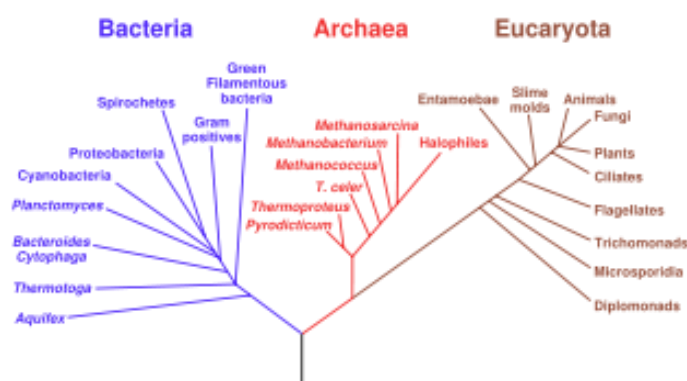


Figura 2: Árvore filogenética dos três domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eucaryota*. (adaptado de WOESE *et al.*, 1990)

O domínio *Bacteria* contém muitos ramos exibindo propriedades fisiológicas diversas (BALOWS *et al.*, 1992). Uma bactéria ancestral deu origem às demais bactérias atuais que evoluíram com a capacidade de utilizar vastas e diversas fontes de energia disponíveis. Algumas fazem fotossíntese, convertendo a energia luminosa em energia celular, outras são quimioautotróficas que usam compostos inorgânicos como fontes de energia, e, ainda, as quimiorganotróficas que obtêm energia de compostos orgânicos (ATLAS; BARTHA, 1998).

As arqueias se diferenciam de outros organismos vivos, representando claramente um grupo evolucionário distinto dos domínios *Bacteria* e *Eucarya* (WOESE, 1993). As arqueias possuem propriedades fisiológicas distintas, muitas das quais parecem se relacionar com a história evolutiva quando a Terra era quente e anaeróbica (HEATHCOCK *et al.*, 1985; ZILLIG, 1991). Entre essas propriedades, as arqueias possuem membranas citoplasmáticas que são quimicamente distintas, possuindo hidrocarbonetos ramificados e ligações éter, comparadas com as membranas lipídicas com ligações éster encontradas em todos os outros seres vivos, algumas formam tetraedros e possuem membranas em monocamadas em vez da típica camada bilipídica. Em vez do peptídeoglicano, típico de bactérias, a parede celular das arqueias consiste de proteínas e glicoproteínas, algumas contêm pseudomureína (ATLAS; BARTHA, 1998).

O domínio *Archaea* se subdivide em arqueias metanogênicas (produtoras de metano), halofílicas (afinidade com ambientes salinos) e termoacidofílicas (afinidade com ácidos e calor). Ocorrem também em lamas e solos deplecionados de oxigênio (anóxidos), ou lugares similares: fontes quentes, ambientes geotermiais (fundo oceânico com alta temperatura, liberação de gases e ausência de oxigênio), mares salgados, lamas ferventes e cinza vulcânica (ATLAS; BARTHA, 1998).

As bactérias e arqueias são os organismos mais disseminados pela Terra, vivem praticamente em todos os ambientes e sobrevivem numa extraordinária abrangência de habitats hostis aos seres eucarióticos (ATLAS; BARTHA, 1998).

#### **2.4. Métodos de estudo de micro-organismos**

Durante muitas décadas, microbiologistas viam-se intrigados pela observação de que a maioria dos micro-organismos em ambientes naturais não é acessada pelo cultivo em laboratório. De fato, em solos pelo mundo, normalmente menos de 1% das células observadas por contagem direta é recuperado por métodos de cultivo tradicionais. Uma das

razões para explicar essa diferença pode ser atribuída à interdependência de diferentes organismos com outros, outra razão é certamente a falta de conhecimento das condições reais nas quais a maioria dos micro-organismos está crescendo em seus ambientes naturais (SCHMIDT, 2006).

A grande maioria dos micro-organismos de ambientes naturais era inacessível à investigação científica até o advento da análise filogenética molecular, um método que utiliza a heterogeneidade dentro da sequência do rRNA para inferir relações evolutivas (LILES *et al.*, 2003).

Os RNAs ribossomais estão entre as macromoléculas mais conservadas em todos os sistemas vivos. Grandes porções de genes do rRNA possuem sequências conservadas que podem ser utilizadas para medir a distância evolutiva mesmo entre organismos mais distantemente relacionados. De fato, diferenças na sequência de nucleotídeos do rRNA são índices de mudanças evolutivas.

Existem 3 rRNAs em bactérias, 5S (~120 nucleotídeos), 16S (~1600 nucleotídeos) e o 23S (~3000 nucleotídeos). Os rRNAs 5S e 16S têm sido os mais utilizados para a maioria das caracterizações filogenéticas baseadas na análise do rRNA, principalmente por razões técnicas e históricas. O rRNA 5S, por ser relativamente pequeno, foi largamente utilizado no final dos anos 60 para análise de sequências. Entretanto, a escassez de regiões de variabilidade no rRNA 5S limitou a sua utilização. O rRNA 16S tem tamanho apropriado para análises filogenéticas, mas era muito extenso para sequenciamento até o desenvolvimento da clonagem e de protocolos mais modernos de sequenciamento (OLSEN *et al.*, 1986). Particularmente em bactérias e arqueias, o rRNA 16S é usado para determinar as relações filogenéticas (ATLAS; BARTHA, 1998).

Woese e colaboradores (1990), ao estudarem o rRNA 16S, argumentaram que este é um excelente cronômetro molecular pelo fato de que é encontrado em todos os organismos, possui longas regiões altamente conservadas ao mesmo tempo que tem regiões suficientemente variáveis para determinar relações filogenéticas próximas e não estão sujeitas a sofrer mudanças rápidas de sequência pela sua função central na expressão de genes.

Devido principalmente a pesquisas com o gene que codifica o rRNA 16S, os estudos das relações filogenéticas e a biogeografia de micro-organismos do ambiente estão emergindo e trazendo novos conhecimentos de ecossistemas planctônicos (VIEIRA *et al.*, 2007). Esses estudos contribuíram para desmitificar o conceito de que populações



bacterianas são homogêneas em escalas temporal e espacial (CRUMP *et al.*, 2004; FUHRMAN *et al.*, 2006). Pelo contrário, dados sugerem que comunidades bacterianas são heterogêneas em abundância (ANDRADE *et al.*, 2003), atividades fisiológicas (SERVAIS *et al.*, 2003) e diversidade de filotipos (HEWSON; FUHRMAN, 2004) em gradientes tróficos.

A diversidade de micro-organismos está relacionada com o tempo de residência da água, taxa de crescimento microbiano e características ambientais. Estudos filogenéticos evidenciaram que populações de bactérias e arqueias são complexas, cosmopolitas e geralmente consistem em membros não-cultiváveis ou não identificados (PACE, 1997).

Com o advento das técnicas de metagenômica, o estudo de comunidades microbianas não-cultiváveis tornou-se possível e contribuiu significativamente para um melhor entendimento da ecologia microbiana em diversos ecossistemas (PACE *et al.*, 1986). A aplicação dessas técnicas em estudos de ecologia microbiana tornou-se um novo ramo de estudo: ecologia microbiana molecular (AKKERMANS; VAN ELSAS; DE BRUIJN, 1995).

Ao contrário da genômica, que tem como foco o sequenciamento do DNA de um organismo, a metagenômica envolve o acesso à sequência de uma comunidade de organismos que habitam um determinado ambiente, como também qualquer tipo de análise de DNA obtido diretamente do ambiente. A metagenômica vem se tornando uma tecnologia básica usada para estudos de ecologia e evolução de micro-organismos (HUGENHOLTZ; TYSON, 2008)

A biogeografia de assembleias microbianas em ecossistemas estuarinos tropicais ainda não foi bem estudada (BALDWIN *et al.*, 2005). Propriedades físico-químicas e microbiológicas podem ser muito diferentes no ambiente estuarino. Uma variedade de métodos é capaz de extrapolar informações de frequências de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) ou curvas de abundância de espécies para prever o número de diferentes táxons microbianos presentes em amostra de um local (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005).

As técnicas dependentes de PCR mais comuns são o DGGE (MUYZER *et al.*, 1993), o polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição terminal (T-RFLP; LIU *et al.*, 1997), o polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP; SCHWIEGER; TEBBE, 1998), a análise do espaço intergênico ribossomal (RISA; RANJARD *et al.*, 2000), o RISA automatizado (ARISA; CARDINALE *et al.*, 2004), e a análise de sequências de bibliotecas de clones do gene 16 rRNA (OLSEN *et al.*, 1986). Todas essas abordagens têm vantagens e desvantagens que precisam ser consideradas na escolha do método a ser utilizado

(NAKATSU, 2004).

A técnica de PCR-DGGE, especialmente, se tornou um meio rápido de se comparar e estudar a estrutura de comunidade sem o uso de metodologias de cultivo (TORSVIK; ØVREÅS, 2002). Pesquisadores vêm utilizando o PCR-DGGE para investigar aspectos básicos de comunidades de solo, tais como diferenças ou modificações na estrutura da comunidade em resposta ao ambiente, ao espaço, ao tempo e a perturbações sofridas na comunidade. (NAKATSU, 2004).

A técnica de DGGE consiste na eletroforese de fragmentos do 16S rDNA amplificados por PCR, onde cada um dos iniciadores apresenta uma região rica em G+C (grampo G-C) que visa impedir a total desnaturação da dupla fita do DNA durante a eletroforese, em gel de poliacrilamida contendo um crescente gradiente de desnaturantes (uréia e formamida) que rompe as pontes de hidrogênio entre os nucleotídeos, possibilitando a separação de fragmentos do mesmo tamanho mas com composição nucleotídica diferente. A separação no DGGE é baseada na mobilidade eletroforética da molécula de DNA parcialmente desnaturada no gel de poliacrilamida. As variações nas sequências dos diferentes fragmentos de DNA de uma amostra irão parar de migrar no gel em posições diferentes, gerando um padrão de bandas característico de cada comunidade estudada (Fig. 3) (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993).

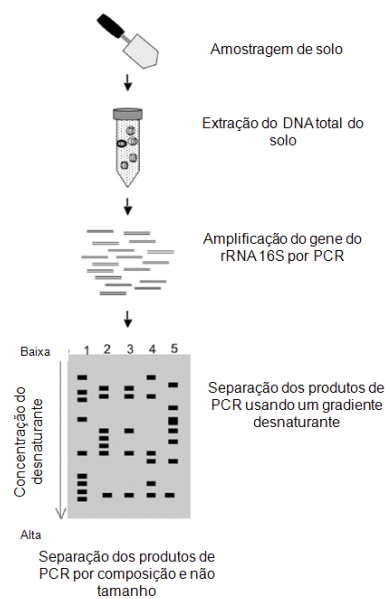


Figura 3: Esquema indicando as etapas de realização de estudos de comunidades microbianas do solo pela técnica de DGGE (adpatado de NAKATSU, 2007).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Este trabalho teve por objetivo desvendar a estrutura das comunidades microbianas habitantes do solo superficial da rizosfera de *Rhizophora mangle* do manguezal do Rio Pacoti - CE, visando conhecer o padrão dessas comunidades e os fatores que governam sua distribuição.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Aplicar a técnica de DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) para análise de diversidade;
- Verificar a ocorrência de variações na estrutura das comunidades microbianas entre os pontos e entre os períodos de coleta (seco e chuvoso);
- Relacionar ocorrência dos micro-organismos com os fatores ambientais acessados.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Área de estudo

O Manguezal do Rio Pacoti localiza-se na região metropolitana de Fortaleza (RMF), entre os municípios de Fortaleza, Aquiraz e Eusébio, litoral leste do estado do Ceará. Sua bacia hidrográfica é a maior da RMF. Atualmente, sofre impactos ambientais tais como a poluição da água, desmatamento da vegetação nativa, principalmente vegetação de dunas e de mangue, extração de areia, argila, pedra e lançamento de efluentes industriais causando, erosão assoreamento e a consequente diminuição da biodiversidade local (CAMPOS *et al.*, 2003). A especulação imobiliária na foz do rio é grande, principalmente na região do Porto das Dunas (Fig. 4) (COSTA, 2004). O estuário possui aproximadamente 15 km de extensão e o manguezal, 160 hectares. Em 15 de Fevereiro de 2000: foi criada a APA do Rio Pacoti, com 2.915 hectares.



Figura 4: Impactos sofridos na área do Manguezal do rio Pacoti. A – Empreendimentos imobiliários às margens do rio, B – Assoreamento na foz do Rio Pacoti. Foto A: Acervo pessoal. Foto B: CAMPOS *et al.*, 2003.

## 4.2. Coleta

O solo foi coletado de três pontos distintos do manguezal do Rio Pacoti (Fig. 6) em maré baixa de amplitude de 0.0 a 0.3 na rizosfera de *Rhizophora mangle* na profundidade de 0 a 10 cm. Foram feitas quatro coletas, duas no período seco (S1, em outubro de 2007 e S2, em novembro de 2008) e duas no período chuvoso (C1, em maio de 2008 e C2, em junho de 2009). O primeiro ponto de coleta situa-se o mais próximo ao mar, enquanto o terceiro ponto encontra-se principalmente sob a influência do rio, sendo o segundo ponto intermediário aos dois. O solo foi coletado de cada ponto, com auxílio de um amostrador cilíndrico de PVC, de acordo com o seguinte procedimento: um quadrado de 2 m de lado foi demarcado e foram coletadas amostras de seus vértices e de um ponto central, perfazendo 5 amostras de cada ponto de coleta. As amostras de solo destinadas às análises moleculares foram armazenadas em frascos estéreis (Fig. 5) e postas em caixa térmica com gelo. O solo destinado para análises físico-químicas foi acondicionado em sacos plásticos. As amostras de solo coletadas foram imediatamente levadas ao Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LemBiotech), onde uma parte do solo foi centrifugada para a retirada da água intersticial, da qual foram medidos pH e salinidade e as outras partes foram armazenadas em congelador para as análises moleculares e secas em estufa para as análises de granulometria e matéria orgânica.



Figura 5: Procedimento de coleta do solo, mostrando a retirada do solo com o amostrador de PVC e acondicionamento das amostras em frascos estéreis.

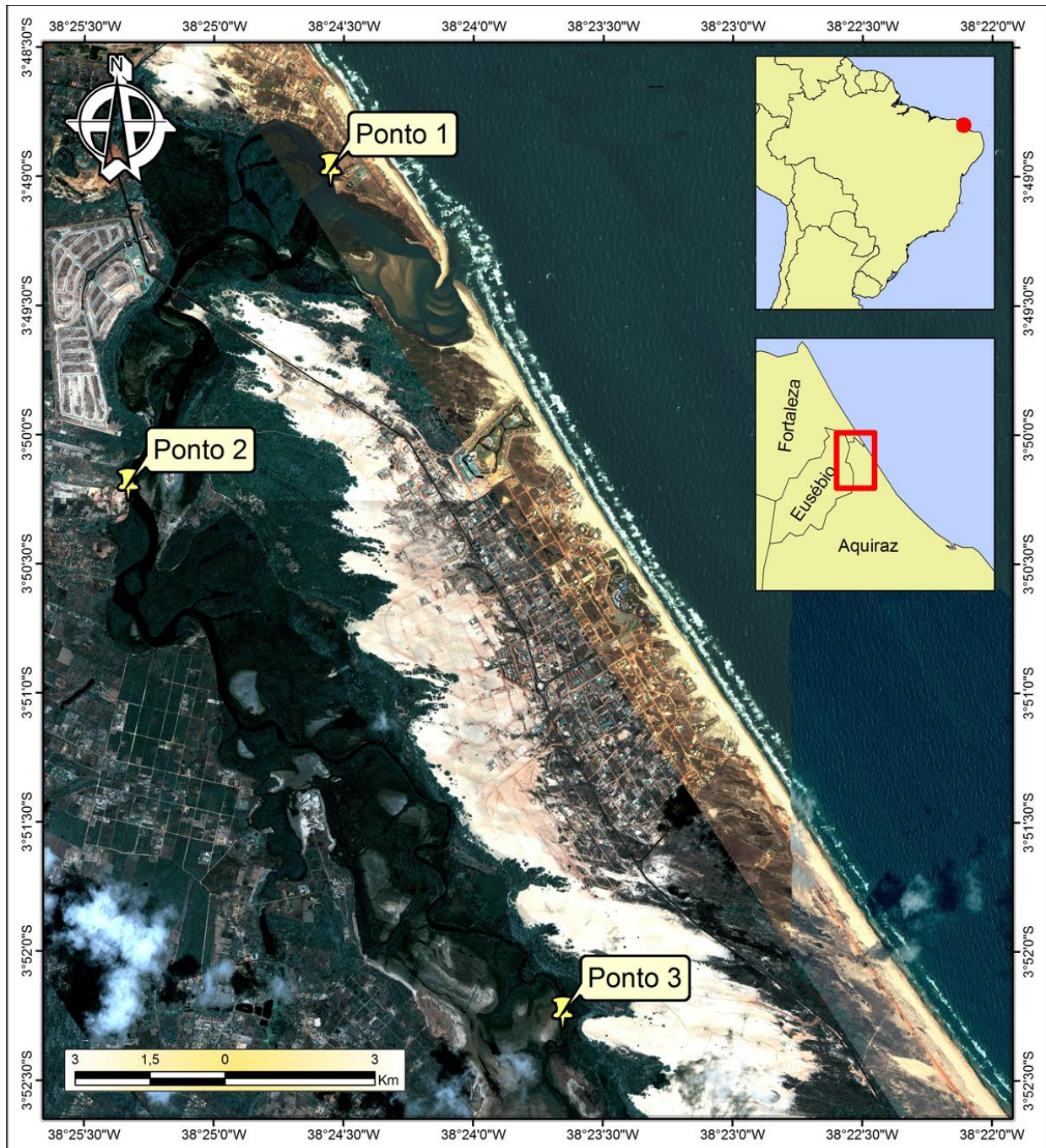


Figura 6: Localização dos pontos de coleta no manguezal do Rio Pacoti – CE.

#### 4.3. Análises granulométricas

O solo, após secagem em estufa a 60°C, foi pesado em duplicatas de 100 g cada e lavado em peneira de abertura de malha de 0,062 mm para a separação da fração silte-argila da areia. A areia retida na peneira foi retirada e posta em frascos para secagem em estufa a

60°C. A areia seca foi submetida à agitação em um conjunto de peneiras de decrescente abertura de malha (de 4,75 a 0,062 mm). As frações retidas em cada peneira foram pesadas e esses dados serviram de entrada para o programa de análise granulométrica ANASED 5j, desenvolvido pelo Laboratório de Geologia Marinha e Aplicada – UFC. A classificação nominal foi dada segundo Folk e Ward (1957) e as porcentagens de areia, silte e argila na escala de Wentworth (1922).

#### 4.4. Teor de matéria orgânica

A determinação do teor de matéria orgânica foi feita pelo método de perda de peso por ignição (PPI), descrita por Schulte e Hopkins (1996), na qual as amostras de solo secas em estufa a 60°C foram postas em cadinhos, previamente secos em dessecador, em triplicatas de 0,5 g. As amostras foram colocadas em mufla a 550°C por 4 horas. Após resfriamento, as amostras foram novamente pesadas e o teor de matéria orgânica foi calculado pela fórmula:  $M.O. (g/Kg) = [(M_i - M_f)/M_i] * 1000$ , na qual M.O. é a matéria orgânica, M<sub>f</sub> é a massa após combustão e M<sub>i</sub>, a massa inicial.

#### 4.5. Extração de DNA

Antes do procedimento da extração, as 5 amostras de solo coletadas de cada ponto foram homogeneizadas e feitas subamostras compostas de cada ponto de coleta. A extração de DNA total foi feita em triplicata utilizando-se o kit comercial *PowerSoil™ DNA Isolation kit Sample* (MoBio, USA), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante que se resume na pesagem de aproximadamente 0,25 g de solo, sendo adicionadas a microtubos contendo esferas em solução e homogeneizados. A lise celular ocorre por mecanismos físicos e químicos. Nas etapas que seguem, o DNA genômico total de cada amostra é capturado por uma membrana de sílica contida em uma coluna do tipo *spin*. O DNA é lavado e, então, eluído da membrana utilizando-se 100 µL de água estéril ausente de DNase. A quantificação do DNA extraído foi feita em espectrofotômetro tipo *nanodrop* (NanoDrop Technologies, USA). As amostras foram armazenadas a -20 °C.

#### 4.6. PCR – DGGE

Para análise das comunidades de bactérias por DGGE, primeiramente foi feita uma reação de amplificação utilizando os iniciadores 338F GC (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA 3') e 518R (5' ATT.ACC GCG GCT GCT GG 3') específicos para a região variável V3 do rRNA 16S. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) nas seguintes condições: 95°C por 5 min, 30 ciclos de 92°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, e um período de extensão final a 72°C por 10 min. Já para arqueias, foi feita uma primeira amplificação com os iniciadores universais para o rRNA 16S, 20F (5' TTC CGG TTG ATC CYG CCR G 3') e 958R (5'-YCC GGC GTT GAM TCC AAT T-3'), nas condições de 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 1 min; e uma extensão final de 72°C por 10 min. O volume de 1 µL dos produtos dessa amplificação foram utilizados como molde para uma nova amplificação utilizando os iniciadores específicos para a região V3 do rRNA 16S, 340F GC (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC CTA CGG GGY GCA SCA 3') e 519R (5' TTA CCG CGG CKG CTG 3'), sob as seguintes condições: 95°C por 5 min e 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72 °C por 1 min e um período de extensão final a 72°C por 6 minutos. Todas as reações foram feitas usando de 10 a 20 ng/µL de DNA total do solo, o que correspondia a um volume de 1 µL. Todas as reações foram de 25 µL e continham: 2,5 µL de tampão para PCR 10X; 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 0,5 µL de dNTP 10 mM; 0,2 µL de Taq Polimerase 5U (Invitrogen); 1 µL de cada primer a 5 pmol e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada, completando o volume final. Os produtos gerados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 2%, marcado com SYBR® Safe DNA (Invitrogen) em TBE 0,5X, utilizando-se um sistema de fotodocumentação ultravioleta (UVP). Como padrão de tamanho de DNA, foi utilizado um marcador de massa molecular de DNA de 1Kb (Invitrogen). Os amplicons gerados foram separados por DGGE. Os géis de acrilamida 8% foram preparados com gradientes desnaturantes de 30 a 65%, usando uma solução desnaturante 100% (7M uréia e 40% formamida) e uma solução 0% (sem uréia e formamida) (ØVREÅS *et al.*, 1997). A eletroforese foi realizada a 60°C e a 200V constantes por 4h, em um sistema DCode (BioRad), utilizando a solução tampão TAE 0,5X. Após a eletroforese, o gel foi imerso em solução de SYBR-Green I (Molecular Probes) na concentração de 1:10.000 (v/v) por 1h, utilizando-se um agitador horizontal. A imagem do gel foi capturada em um sistema de fotodocumentação ultravioleta (UVP).



#### **4.7. Análise dos dados**

Para análise dos géis de DGGE a plataforma GelCompar II do programa BioNumerics (Applied Maths, Bélgica) foi utilizada para normalização, conversão e comparação das imagens em matrizes de presença/ausência e intensidade de bandas. A normalização e seleção de bandas, feita pelo programa, foram cuidadosamente avaliadas e correções manuais foram feitas quando necessárias. Com o auxílio do programa, foram gerados agrupamentos hierárquicos, análises de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS) e matrizes considerando presença ou ausência das bandas, as quais foram utilizadas para análises subsequentes de índices de diversidade, usando o programa Primer versão 6.0 e de correlação dos dados ambientais com a ocorrência das bandas, determinada pela Análise de Componentes Principais (PCA), realizada pelo programa Canoco (Canoco 4.5, Biometris, Wageningen, Holanda).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Variáveis ambientais e características do solo

Os valores das variáveis ambientais (pH e salinidade) e características do solo (matéria orgânica, fração silte-argila e classificação granulométrica do solo) dos solos da rizosfera de *Rhizophora mangle* do manguezal do Rio Pacoti nos 3 pontos de coleta e nos períodos seco (S1 e S2) e chuvoso (C1 e C2) estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Variáveis ambientais dos pontos e períodos de coleta e características gerais dos solos.

Ponto / Período	pH	Salinidade	Matéria Orgânica (g/Kg)	Silte + Argila (%)	Classificação do solo
1 S1	7,49	47	39,04	21,45	Areia
2 S1	7,26	53	99,48	43,84	Areia lamosa
3 S1	6,41	40	107,11	94	Lama
1 C1	7,43	34	105,22	71,86	Lama arenosa
2 C1	7,65	35	70,82	35,81	Areia lamosa
3 C1	7,27	8	114,88	92,47	Lama
1 S2	6,80	47	32,91	18,38	Areia
2 S2	7,36	46	57,66	33,08	Areia lamosa
3 S2	6,70	34	155,31	93,98	Lama
1 C2	6,98	26	32,63	16,17	Areia
2 C2	7,69	25	55,16	27,77	Areia lamosa
3 C2	7,57	6	124,13	93,21	Lama

Através da observação dos dados da tabela 1 é possível afirmar que o ponto 3 apresentou teores de matéria orgânica e silte-argila mais elevados do que nos pontos 1 e 2, mais próximos ao mar. Também se observa que nos períodos chuvosos, houve uma redução na salinidade, sendo esta redução bastante acentuada no ponto 3, por estar sob menor influência do mar. O pH do solo pode ser considerado de ligeiramente ácido a neutro, com valores de pH dos três pontos variando de 6,4 a 7,7 não ocorrendo variações significativas nos valores entre os pontos e períodos analisados.

A figura 7 apresenta o agrupamento com base na matriz de distância euclidiana para fatores abióticos dos pontos 1, 2 e 3 em todos os períodos de coleta. Observa-se que o ponto 3, por apresentar teores mais elevados de matéria orgânica e silte-argila, ficou mais distante dos pontos 1 e 2. É possível notar que o ponto 1 na primeira coleta do período chuvoso (1 C1) agrupou-se com as amostras do ponto 3 por ter apresentado um alto teor de matéria orgânica e de silte-argila, mais semelhantes com os valores encontrados para o ponto 3.

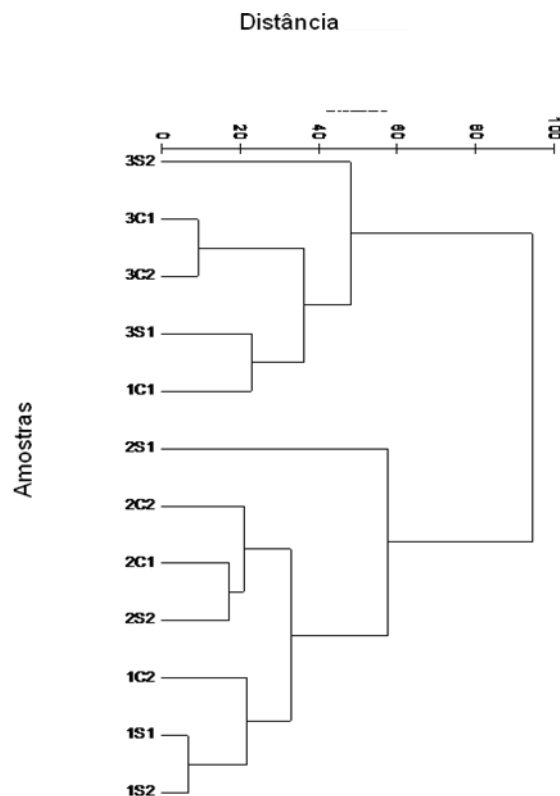


Figura 7. Agrupamento com base na matriz de distância euclidiana para fatores abióticos dos pontos (1, 2 e 3) e períodos (seco e chuvoso) de amostragem do solo do manguezal do Rio Pacoti - CE.

## 5.2. Análise dos padrões de bandas gerados por DGGE

Os perfis das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* de solos da rizosfera de *Rhizophora mangle* dos pontos 1, 2 e 3 nos períodos seco (S1 e S2) e chuvoso (C1 e C2) do manguezal do Rio Pacoti derivados da análise por Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) estão representados na figura 8. Através da análise dessa figura pode-se inferir que os solos dos diferentes pontos de coleta diferem com relação às comunidades de bactérias e arqueias que abrigam, tendo os pontos 1 e 3 se agrupado mais proximamente nas comunidades de bactérias e os pontos 1 e 2 se agrupado mais proximamente nas comunidades de arqueias.

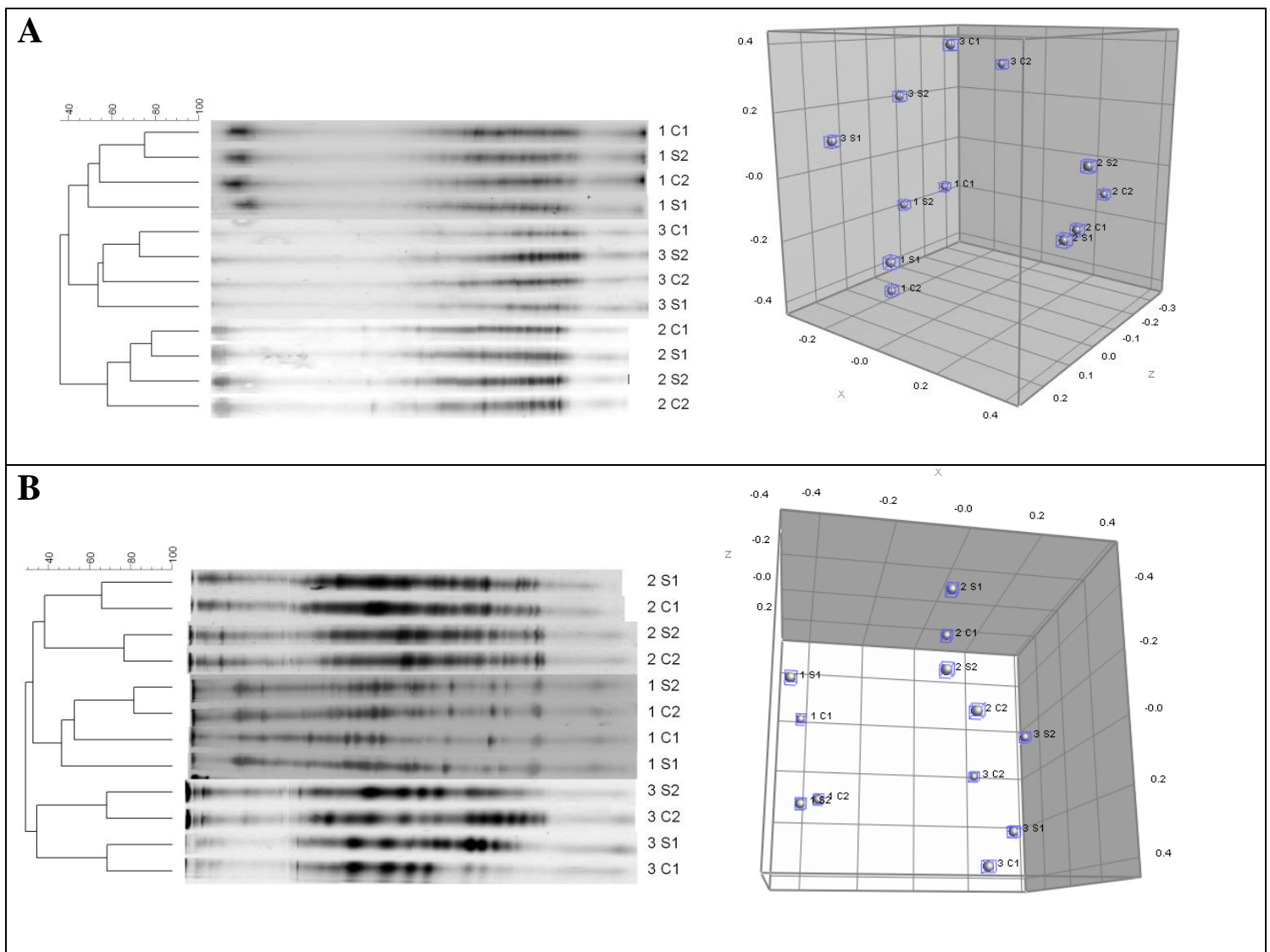


Figura 8. Agrupamentos hierárquicos com base nas distância de Jaccard e no algoritmo UPGMA e Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS) definidos a partir dos padrões de bandas obtidos por DGGE para *Bacteria* (A) e *Archaea* (B) nos pontos e períodos amostrados.

Através dos dados de presença e ausência de bandas em perfis de DGGE foram feitas análises de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS). A análise de NMDS é uma técnica de ordenação utilizada em análises ecológicas que tem por objetivo descrever a estrutura de uma matriz complexa, ordenando objetos em um gráfico. Essa técnica tem por objetivo gerar uma proporcionalidade entre as distâncias dos objetos no espaço plotado e as distâncias entre os objetos no espaço multidimensional original, dessa forma, pontos que foram plotados próximos apresentam maior similaridade entre si. Desta forma, pode-se perceber que os pontos ficaram separados no espaço plotado, mostrando que a estrutura de comunidades microbianas difere entre os pontos de coleta (Fig. 8).

Quanto aos períodos de coleta não foi possível encontrar um padrão na variação das comunidades, embora nas comunidades de arqueias tenha havido uma tendência de agrupamento anual e não sazonal.

Também com os dados de presença e ausência de bandas em perfis de DGGE foram criadas matrizes binárias para comparações quantitativas entre as comunidades. Primeiramente foi analisada a riqueza de UTOs das comunidades de bactérias e arqueias. (Fig. 9). Pode-se observar que as comunidades de arqueias apresentaram maior riqueza em relação às de bactérias.

Com exceção dos pontos 1 S1 e 2 S2 que apresentaram riquezas maiores, no geral, a riqueza das comunidades bacterianas entre pontos e períodos foi semelhante. Já em arqueias, o ponto 2 apresentou maior riqueza do que ponto 1 que, por sua vez, teve maior riqueza que o ponto 3.

Os diagramas de Venn (Fig. 9) foram construídos para a melhor visualização de UTOs exclusivos e compartilhados entre os pontos, reunindo os UTOs de todos os períodos analisados. A análise desses diagramas mostra que os 3 pontos compartilham a maioria dos UTOs tanto de bactérias como de arqueias, apresentando poucos exclusivos.

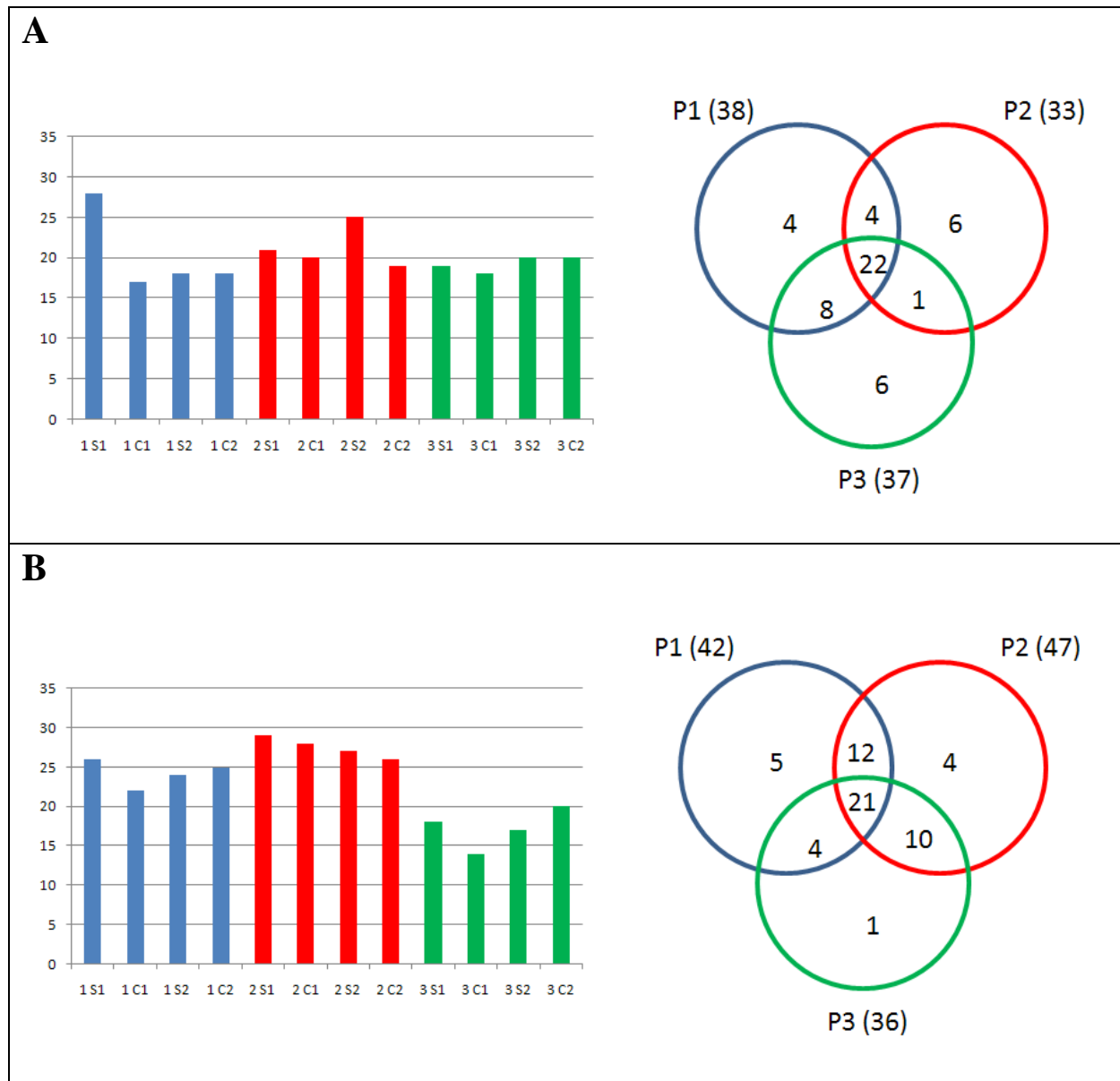


Figura 9. Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) detectadas com a técnica de DGGE e Diagramas de Venn baseado nas UTOs para os grupos *Bacteria* (A) e *Archaea* (B).

### 5.3. Índices de diversidade de Unidades Taxonômicas Operacionais

As matrizes de presença e ausência de UTOs nas amostras de solos obtidas através das análises de DGGE foram também analisadas por índices ecológicos (Tabelas 2 e 3). Os índices apontaram similaridades em termos de riqueza, equitabilidade e diversidade entre as comunidades de bactérias e arqueias dos pontos e períodos analisados.

Tabela 2. Índices de diversidade para as comunidades de *Bacteria* de amostras de solos do manguezal do Rio Pacoti, CE.

Amostra	S	d	J'	H'	$\lambda$
1 S1	28	3,555	0,972	3,239	0,04098
1 C1	17	2,111	0,9791	2,774	0,0651
1 S2	18	2,289	0,9811	2,836	0,0656
1 C2	18	2,3	0,9626	2,782	0,06758
2 S1	21	2,669	0,9699	2,953	0,05437
2 C1	20	2,609	0,9711	2,909	0,05682
2 S2	25	3,028	0,9723	3,13	0,04563
2 C2	19	2,42	0,9589	2,824	0,06382
3 S1	19	2,598	0,9587	2,823	0,0633
3 C1	18	2,493	0,9595	2,773	0,0668
3 S2	20	2,493	0,9466	2,836	0,06385
3 C2	20	2,606	0,9465	2,835	0,06406

S: número de UTOs; d: riqueza de Margalef; J': equitabilidade de Pielou;  
H': diversidade de Shannon e  $\lambda$ : diversidade de Simpson.

Tabela 3. Índices de diversidade para as comunidades de *Archaea* de amostras de solos do manguezal do Rio Pacoti, CE.

Amostra	S	d	J'	H'	$\lambda$
1 S1	26	3,242	0,9879	3,219	0,04092
1 C1	22	2,748	0,9859	3,047	0,0488
1 S2	24	2,944	0,9908	2,149	0,04362
1 C2	25	3,083	0,9885	3,182	0,04245
2 S1	29	3,523	0,9539	2,212	0,0446
2 C1	28	3,401	0,9652	3,216	0,0431
2 S2	27	3,251	0,9798	3,229	0,04119
2 C2	26	3,128	0,9823	3,2	0,04219
3 S1	18	2,191	0,9533	2,755	0,06923
3 C1	14	1,805	0,906	2,391	0,1064
3 S2	17	2,064	0,965	2,734	0,06912
3 C2	20	2,389	0,971	2,909	0,05721

S: número de UTOs; d: riqueza de Margalef; J': equitabilidade de Pielou;  
H': diversidade de Shannon e  $\lambda$ : diversidade de Simpson.

#### 5.4. Relação das comunidades microbianas com as variáveis ambientais e características do solo

Para correlacionar os dados de presença e ausência de UTOs obtidos por DGGE com as variáveis ambientais e características do solo, utilizou-se a matriz de ordenação gerada pela análise de NMDS para o cálculo da análise de componentes principais (PCA) complementando os dados obtidos através da análise da estrutura de comunidade microbianas por DGGE (Fig. 10).



Para *Bacteria* e *Archaea*, a dimensão 1 ou componente principal 1, explicou 52,8 e 59,6% da variabilidade dos dados, respectivamente, enquanto a dimensão 2 ou componente principal 2 explicou a variabilidade restante, totalizando juntas 100% da variabilidade total dos dados. De maneira geral, evidenciou-se a disposição dos pontos de coleta em quadrantes separados.

Desta forma é possível observar que as comunidades de *Bacteria* e *Archaea* nos diferentes pontos amostrados diferem em estrutura e essas diferenças estão relacionadas aos fatores abióticos analisados. As amostras do ponto 2 se relacionaram com altos valores de pH e salinidade enquanto as amostras do ponto 3 com altos valores de matéria orgânica e silte-argila.

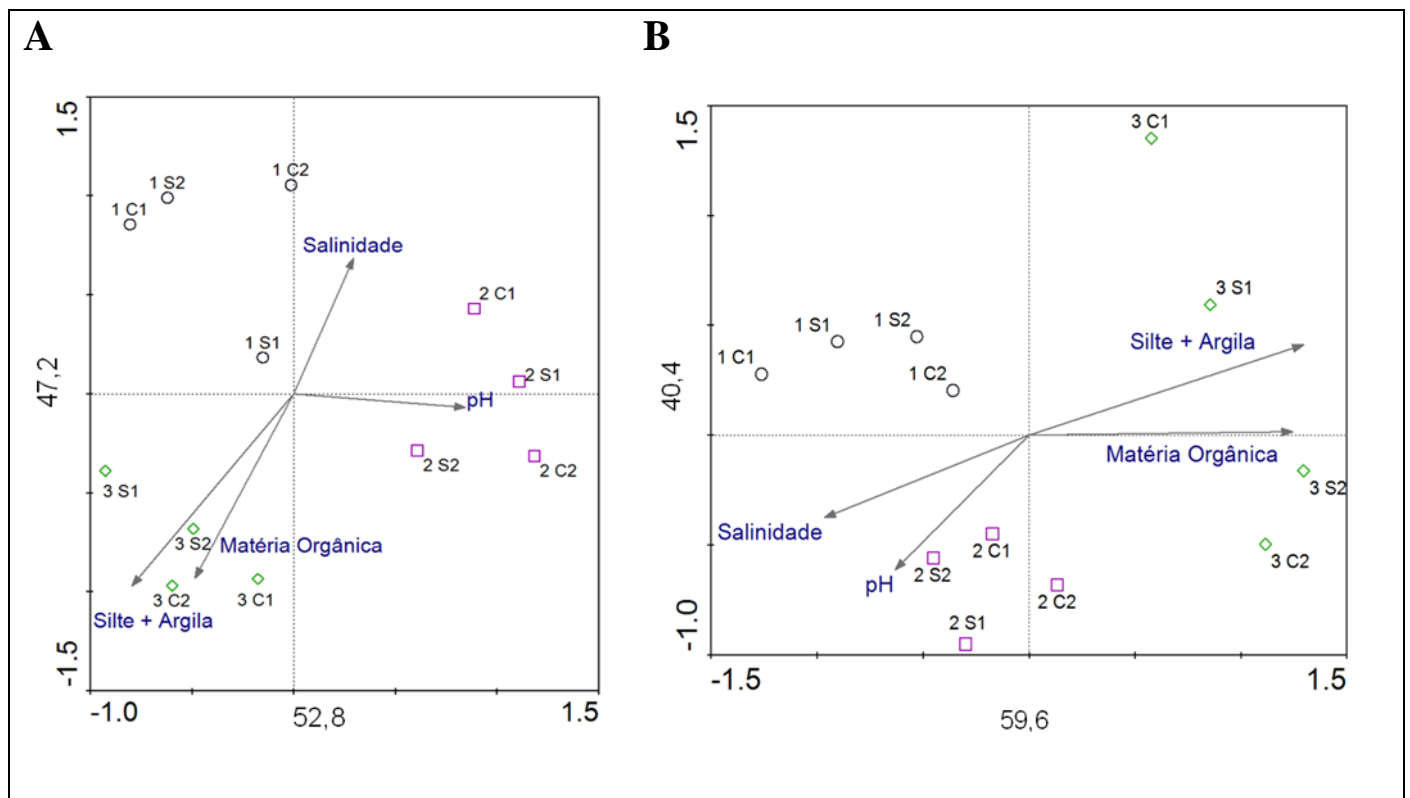


Figura 10: Análise de Componentes Principais das comunidades de *Bacteria* (A) e *Archaea* (B) dos solos estudados.

## 6. DISCUSSÃO

As medidas das variáveis ambientais dos solos do manguezal do Rio Pacoti mostraram que o ponto 3 apresentou maiores valores de matéria orgânica e silte-argila e menores valores de salinidade e maior variação na salinidade do período seco para o chuvoso. Esses resultados podem ser explicados pela maior distância do ponto 3 do mar, tendo menor salinidade, sujeito a um menor hidrodinamismo, e, conseqüentemente, seus solos possuem textura mais fina, retendo, por sua vez, mais matéria orgânica. A maior variação nos valores de salinidade se deve à maior influência de água doce no período chuvoso advinda de um aumento no volume do rio.

Os valores de pH encontrados para o solo de rizosfera de *Rhizophora mangle* neste trabalho foram semelhantes aos encontrados para o manguezal do Rio Jaguaribe também na zona leste do litoral cearense (6,63 e 7,34 para os períodos seco e chuvoso, respectivamente) (NOGUEIRA *et al.*, 2009) como também do Rio Mucuri, na Bahia (7,5 e 7,4 para bosque ribeirinho e bosque de bacia, respectivamente) (CUZZUOL; CAMPOS, 2001).

Cintron e Schaeffer-Novelli (1983) salientam que o pH do solo é uma função do conteúdo de umidade e das flutuações do nível freático. Como os solos da rizosfera de *Rhizophora mangle* estão constantemente sujeitos a inundação, por estarem próximos a margens dos rios, não houve uma variação significativa nos valores de pH nas amostras analisadas.

A salinidade das amostras de água intersticial dos solos de rizosfera de *Rhizophora mangle* do manguezal do Rio Pacoti foi maior nos pontos 1 e 2 do presente estudo. A maior proximidade do mar e a evaporação acentuada nos períodos secos contribuíram para a alta salinidade encontrada nesses pontos. Segundo Soto e Jiménez (1982), a salinidade pode estar relacionada às condições climáticas e edáficas. Em lugares áridos, os períodos prolongados de seca, como é o caso dos manguezais de regiões do nordeste semi-árido, temperaturas altas e substrato arenoso favorecem a elevação do gradiente salino.

Os pontos 1 e 2 também apresentaram maiores teores de areia devido ao maior hidrodinamismo das áreas, confirmando observações de que salinidades mais altas coincidem com os sítios mais ricos em partículas arenosas sustentadas por Soto e Jiménez (1982).

Quanto aos valores de matéria orgânica, estes são função das características dos solos, estando em maior quantidade em solos de granulometria fina, e a granulometria, por sua vez, é influenciada pelo hidrodinamismo do ambiente, quanto menor for o hidrodinamismo, menor serão as partículas do solo. No caso deste estudo, como pontos de coleta estavam numa distância crescente da influência do rio, os valores de matéria orgânica e granulometria responderam de acordo com essa variação, sendo essas variáveis maiores no ponto 3.

Schaeffer-Novelli, Lima-Mesquita e Cintron-Molero (1990) comentam que na região de Cananéia, estado de São Paulo, quando da influência mais pronunciada das águas dos rios os solos contêm mais matéria orgânica (145 g/Kg) e são na maioria de granulometria fina e muito fina, resultados semelhantes ao que foram encontrado neste estudo.

Locais sujeitos às variações da maré possuem solos anaeróbicos e redutores combinados com elevados teores de M.O., como foi constatado no solo de *Rhizophora mangle*. Desse modo, essa espécie parece ser mais adaptada à parte inferior do estuário, caracterizada por solos encharcados e anaeróbicos (TOMLINSON, 1986).

É notável, ao analisar essas variáveis ambientais e as características do solo, que o ponto 3 é mais diferente dos pontos 1 e 2, observação que foi confirmada pela matriz de distância feita com os fatores abióticos analisados, na qual os pontos 1 e 2 apresentaram uma menor distância entre si e ambos distantes do ponto 3.

Para estudar as variações na estrutura e diversidade das comunidades de bactérias e arqueias do solo da rizosfera de *Rhizophora mangle* do manguezal do Rio Pacoti nos três pontos amostrados e nos períodos seco e chuvoso a técnica de DGGE foi utilizada. Esta técnica consiste na separação, através da utilização de desnaturantes que rompem as ligações entre os nucleotídeos, de fragmentos de PCR de mesmo tamanho obtidos do DNA total de uma comunidade, porém com composições nucleotídicas diferentes, gerando um padrão de bandas característico de cada comunidade, permitindo comparações entre 2 ou mais comunidades distintas.

Essa técnica vem sendo eficientemente utilizada em estudos como uma abordagem simples de obtenção de perfis de comunidades microbianas e pode ser usada para identificar diferenças espaciais e temporais na estrutura de comunidades ou para monitorar mudanças na estrutura que ocorrem em resposta a impactos ambientais (MURRAY;

HOLLIBAUGH; ORREGO, 1996; MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993; WAWER *et al*, 1995). Além disso, como cada fragmento de DNA no perfil é derivado de populações distintas filogeneticamente, se pode obter uma estimativa do número de UTOs e abundância baseadas no número e na intensidade dos fragmentos amplificados nos perfis (ØVREÅS *et al.*, 1997).

Zhang e colaboradores (2009) estudando comunidades bacterianas de solos de um manguezal da China verificaram que o número de bandas por amostra variou entre 24 e 29 (com média de 26), indicando uma comunidade bacteriana diversa em solos de manguezal. Resultado semelhante foi encontrado neste trabalho, com um número de bandas de comunidade de bactérias variando de 17 a 28 com média de 20.

Walsh, Papke e Doolittle (2005) estudando comunidades de arqueias em solos com gradiente de salinidade também encontraram riquezas semelhantes entre os pontos de coleta, porém a estrutura das comunidades era diferente. Os autores afirmam que esse resultado indica uma mudança clara na estrutura da comunidade de arqueias ao longo de um gradiente de salinidade.

A riqueza de arqueias encontrada neste trabalho foi maior que a de bactérias, resultado diferente dos demais trabalhos que estudaram comunidades de bactérias e arqueias na camada de 1-10 cm de solo de manguezal (CURY, 2002; NUNES, 2006; MENDES, 2009), Este fato pode ser explicado por uma limitação da técnica de DGGE que uma comunidade complexa, como, por exemplo, a do solo, pode ter numerosas populações (de >100 a possivelmente >10<sup>8</sup>) em proporções relativamente equivalentes, deste modo, resultando em um “borrado” de bandas o que torna difícil a identificação de populações individuais (NAKATSU; TORSVIK; ØVREÅS, 2000).

No presente estudo, os géis de *Bacteria* apresentaram muitas bandas que não se resolveram havendo uma subestimação da riqueza de UTOs, enquanto que nos géis de *Archaea* as bandas ficaram mais bem resolvidas, pela menor quantidade de UTOs, dando a impressão de que a riqueza de *Archaea* seria maior.

Porém, ao contrário do que se pensava, as arqueias, como as bactérias, ocorrem em uma ampla variedade de ambientes e somente alguns deles são considerados extremos de alguma forma. Na maioria dos ambientes as arqueias tendem a ter uma diversidade menor do

que bactérias. Entretanto arqueias contribuem com uma grande proporção dos organismos procarióticos presentes na maioria dos ambientes estudados até agora (ALLER; KEMP, 2008) Isso explica porque há uma grande riqueza de arqueias em solos de manguezal.

Gans, Wolinsky e Dunbar (2005) e Torsvik, Sorheim e Goksoyr (1996) discutem que, apesar de os solos abrigarem comunidades microbianas complexas com a riqueza da população estimada excedendo centenas de UTOs, apenas de 20 a 40 bandas em um perfil de DGGE podem ser claramente resolvidas em um gel, sendo impossível para este método detectar a diversidade completa na maioria das amostras de solo. Somente produtos de PCR que têm representatividade de no mínimo 1% da amostra total são observados como bandas em um perfil de DGGE (GELSOMINO *et al.*, 1999).

Em relação aos períodos estudados, não foi encontrado um padrão de variação das comunidades de bactérias. Já em arqueias houve a tendência de agrupamento anual e não sazonal. Isso pode ser explicado pela forma como as arqueias interagem e fazem uso do ambiente de formas mais restritivas do que as bactérias. Por exemplo, as arqueias podem viver em micronichos enquanto as bactérias vivem em ambientes mais amplos ou em micronichos diferentes no mesmo ambiente (ZHANG *et al.*, 2009), deste modo as bactérias são mais suscetíveis a variações no ambiente do que as arqueias .

Walsh, Papke e Doolittle (2005) estudando comunidades de arqueias em solos com gradiente de salinidade discutem que é pouco provável que um declínio na salinidade resulte na extinção de uma comunidade inteira de arqueias e que muitas são capazes de sobreviver a períodos de salinidade reduzida em micronichos com maior salinidade mantida pela natureza heterogênea do solo. Entretanto os autores especulam que arqueias migratórias recolonizam prontamente o solo se a sua população é reduzida depois da estação chuvosa anual, o que reforça o fato de que as comunidades de arqueias resistem a mudanças de condições no ambiente.

Embora os solos estudados apresentem características abióticas diferentes, muitos UTOs, tanto de comunidades de bactérias como de arqueias, foram comuns a todos os pontos de coleta. Este resultado pode ser atribuído ao fato de que todas as amostras foram coletadas de solo de rizosfera de *Rhizophora mangle* e já se sabe de estudos anteriores que a estrutura de comunidades microbianas da rizosfera é influenciada pela espécie de planta, por conta das

diferenças no que é exudado pelas raízes e a deposição em diferentes zonas das raízes (JAEGER *et al.*, 1999; BRIMECOMBE; DE LEIJ; LYNCH, 2001).

Em seu trabalho, Costa e colaboradores (2006), estudando comunidades bacterianas de solo por DGGE, observaram que indiferentemente do local de coleta, solos que não eram de rizosfera e de rizosfera abrigavam comunidades microbianas diferentes em abundância de UTOs (efeito rizosférico) e que a abundância de algumas populações bacterianas na vizinhança das raízes estava condicionada à espécie de planta. Os autores ainda afirmam que tipo de planta e o local de amostragem, agem em conjunto determinando a composição microbiana na rizosfera. É importante enfatizar que o que está sendo chamado de “local de amostragem” se refere a áreas com grandes variações de fatores ambientais e bióticos, tais como a estrutura do solo e variáveis físico-químicas, disponibilidade de nutrientes, conteúdo de matéria orgânica, condições climáticas locais, histórico de uso da terra e manejo. Todos esses fatores foram demonstrados como tendo papel na dinâmica de comunidades do solo (LATOURET *et al.*, 1996; HORWATH; ELLIOTT; LYNCH, 1998; LUPWAYI; RICE; CLAYTON, 1998; MARSCHNER *et al.*, 2001; SESSITSCH *et al.*, 2001; SCHÖNFELD *et al.*, 2002; GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004; SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004) e podem estar agindo simultaneamente na determinação da composição da microbiota indígena.

Marschner *et al.* (2001) propuseram ainda que há uma interação complexa entre o tipo de solo e a espécie de planta que afeta a composição da comunidade bacteriana e a contribuição de cada fator varia em cada caso.

Neste estudo as comunidades de bactérias e arqueias apresentaram estruturas diferentes, ocasionadas pelas diferentes características do solo e variáveis ambientais encontradas nos pontos de coleta, porém a grande quantidade de UTOs compartilhados pelos pontos pode ser explicada pela atuação do efeito rizosférico que determina a ocorrência de determinados grupos de micro-organismos.

Os índices de diversidade são úteis como uma abordagem inicial para estimar a diversidade de comunidades microbianas, por exemplo, quanto maiores os valores de  $H'$ , maior a diversidade da comunidade microbiana. Os índices de diversidade consistem em dois componentes: o número total de espécies ou riqueza de espécies e a distribuição do número de indivíduos dessas diferentes espécies, a equitatividade (KENNEDY; SMITH, 1995).

Estudando comunidades bacterianas do solo do manguezal da Barra Grande – CE, Rocha (2008), pela técnica de polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição terminal (T-RFLP), constatou que os valores dos índices de diversidade Simpson e Shannon, riqueza de Margalef e equitabilidade de Pielou observados foram semelhantes em todas as amostras, o qual confirma que a diferença em quantidade de UTOs nos solos dos três pontos do manguezal estudado pela autora não foi significativa. A autora atribuiu esses resultados a um estágio de equilíbrio dessa comunidade bacteriana.

De fato, Atlas (1984) comenta que comunidades instáveis são caracterizadas pela dominância de alguns poucos organismos e, conseqüentemente, uma baixa diversidade.

Em áreas poluídas e em monoculturas, a diversidade de substratos que pode ser utilizados pelos micro-organismos é bastante reduzida. Em áreas poluídas por compostos orgânicos como solos de áreas impactadas por fazendas de camarão, a maioria dos substratos é representada por carboidratos prontamente degradáveis, proteínas e lipídeos em contraste com solos de áreas não impactadas nas quais a componente orgânico mais abundante é o ácido húmico. A redução de nichos resulta em uma redução na diversidade bacteriana. Alterações podem também dar uma vantagem seletiva a algumas populações bacterianas as quais se adaptam e crescem rapidamente nas novas condições. As análises de DGGE revelam redução na diversidade e que populações tornam-se dominantes em ambientes impactados (TORSVIK *et al.*, 1998).

Em solos ricos em matéria orgânica, como os deste estudo, o número de diferentes substratos é muito grande. As bactérias não se especializam em um único substrato, mas a diversidade delas tem a habilidade de utilizar combinações de substratos em diferentes condições físico-químicas (BROCK; MADIGAN, 1988). Portanto a não dominância de UTOs e uma semelhança nos índices de diversidade entre pontos e períodos analisados, revelam um estágio de equilíbrio das comunidades microbianas do solo neste manguezal.

Por causa das limitações inerentes à técnica de DGGE, os índices de diversidade calculados pelo padrão de bandas obtidos por DGGE devem ser interpretados apenas como uma indicação e não uma medida absoluta do grau de diversidade em uma comunidade microbiana (EICHNER *et al.*, 1999).

Um organismo pode produzir mais de uma banda no DGGE devido à presença de múltiplas cópias do *operon* do rRNA (NÜBEL *et al.*, 1996; RAINEY, *et al.*, 1996; CILIA; LAFAY; CHRISTEN, 1996). Por outro lado, sequências parciais do rDNA 16S nem sempre permitem a discriminação entre espécies, fazendo com que uma banda do DGGE possa representar várias espécies com sequências parciais do rDNA 16S idênticas (VALLAEYS *et al.*, 1997). E, ainda, em uma mistura de rDNAs alvo presentes em várias concentrações, as sequências menos abundantes não são amplificadas suficientemente para serem visualizadas como bandas em um gel de DGGE. Portanto, o padrão de bandas obtido no DGGE reflete apenas os táxons mais abundantes de uma comunidade microbiana (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993). Essas limitações da metodologia dificultam a interpretação dos resultados no que se refere à estimativa de diversidade, porém não invalidam sua utilização para detectar alterações das comunidades.

Uma razão importante para se utilizar índices de diversidade é que muita informação pode ser descrita por um número. Porém também pode esconder informações importantes, pois os índices de diversidade indicam somente se as comunidades são diferentes, mas não o que contribui para essas diferenças (ØVREÅS; TORSVIK, 1998).

Variáveis ambientais afetando comunidades de bactérias no solo têm sido detalhadas há vários anos (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). Os resultados de Alexander (1971) mostraram que a presença e ausência de gêneros particulares de bactérias cultiváveis dependeriam de atributos do solo. Embora se conheça como bactérias cultiváveis respondem a variáveis ambientais em manguezais (TAKIZAQA; COLWELL; HILL, 1993; WU, 1993; WANG; HONG, 2005), pouco se conhece sobre como essas variáveis influenciam a estrutura de comunidades microbianas em solos de manguezal.

Considerando a diversidade de fatores relacionados com a distribuição de espécies em um ecossistema tão complexo como o de manguezal, a aplicação de uma análise multifatorial torna-se desejável para uma interpretação mais precisa sobre a distribuição de espécies nesse tipo de ambiente.

Em geral a relação entre a composição da comunidade bacteriana e os fatores ambientais é complicada em manguezais. A composição da comunidade bacteriana varia com as condições ambientais e a variação na composição da comunidade bacteriana pode gerar



uma mudança nas concentrações de nutrientes em ecossistemas de manguezal (ZHANG *et al.*, 2009).

Neste trabalho, as análises multivariadas apresentaram-se como importantes ferramentas no estudo de diversidade microbiana e permitiu aumentar a sensibilidade da resposta da análise de perfis de DGGE de comunidades de bactérias e arqueias, sendo as variáveis ambientais e características do solo úteis para a interpretação dos resultados obtidos.

Através da utilização da análise de PCA, foi possível relacionar a ocorrência das comunidades microbianas com as variáveis ambientais, viabilizando identificar quais fatores ambientais estão relacionados com as diferenças de estrutura de comunidades microbianas encontradas entre os pontos de coleta.

Os resultados revelaram que a composição da comunidade microbiana variou em áreas diferentes do manguezal e estavam fortemente correlacionados com a matéria orgânica, conteúdo de silte-argila, salinidade e pH, indicando que essas variáveis influenciariam a estrutura de comunidades microbianas em solos de manguezal. Semelhante resultado foi encontrado para comunidades bacterianas de um manguezal na China, no qual a matéria orgânica, o pH e o fósforo disponível foram as variáveis que influenciaram na estrutura de comunidades bacterianas nos solos de manguezal (ZHANG *et al.*, 2009).

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se afirmar que as comunidades de bactérias e arqueias do solo da rizosfera de *Rhizophora mangle* do manguezal do Rio Pacoti – CE apresentaram composição e estruturas diferentes, devido às diferentes variáveis ambientais e características em que habitam. Apesar das diferenças de condições ambientais às quais essas comunidades estavam submetidas, muitas UTOs são compartilhadas pelos pontos e este fato pode ser explicado pelo efeito rizosférico, já que todas as amostras foram coletadas de rizosfera de *Rhizophora mangle*. As análises de diversidade mostraram que entre os pontos e períodos de coleta não houve diferenças entre os índices analisados e que esses resultados indicam o solo desse manguezal está em equilíbrio dinâmico.

É possível ainda afirmar que as técnicas moleculares e análises empregadas neste trabalho podem ser utilizadas para monitoramento de áreas, sendo este estudo uma primeira análise das comunidades de bactérias e arqueias do solo do manguezal do Rio Pacoti – CE.

## 7. CONCLUSÃO

O solo superficial da rizosfera de *Rhizophora mangle* do manguezal do Rio Pacoti – CE abriga populações diversas e estáveis de micro-organismos. A composição das comunidades microbianas está relacionada com as variáveis ambientais e as características dos solos e a estrutura das comunidades de bactérias e arqueias variou espacial e sazonalmente. A partir dos resultados deste trabalho é possível inferir que os impactos decorrentes da urbanização da região parecem não estar afetando as populações microbianas, já que não se detectou predominância de nenhum UTO, evidenciando que essa comunidade está em equilíbrio.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALLER, J. Y; KEMP, P. F. Are Archaea inherently less diverse than Bacteria in the same environments? **FEMS Microbiology Ecology**, v. 65, p. 74–87, 2008.
- ANDRADE, L. *et al.* Flow cytometry assessment of bacterioplankton in tropical marine environments. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 841–850, 2003.
- AKKERMANS, D. L.; VAN ELSAS, J. D.; DE BRUIJN, F. J. **Molecular Microbial Ecology Manual**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1995.
- ALEXANDER, M. **Microbial ecology**. Wiley, Nova Iorque, 1971.
- ALONGI, D. M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Environmental Conservation**, v. 29, p. 331–349, 2002.
- \_\_\_\_\_. **The Energetics of Mangrove Forests**. Springer, 2009
- ALONGI, D. M. *et al.* Below-ground nitrogen cycling in relation to net canopy production in mangrove forests of southern Thailand. **Marine Biology**, v. 140, p. 855–864, 2002.
- ALONGI, D. M. *et al.* Sediment accumulation and organic material flux in a managed mangrove ecosystem: estimates of land–ocean–atmosphere exchange in peninsular Malaysia. **Marine Geology**, v. 208, p. 383–402, 2004.
- ATLAS, R. M. Diversity of microbial communities. In: Marshall K.C. (ed) **Advances in Microbial Ecology**, Plenum Press, Nova Iorque, v. 7, p. 1–47, 1984.
- ATLAS, R. M.; BARTHA R., **Microbial ecology: fundamentals and applications**. Cummings Science Publishing, 694 p., 1998.
- BAKKER, P. A. H. M. *et al.* Effects of *Pseudomonas putida* modified to produce phenazine-1-carboxylic acid and 2,4-diacetylphloroglucinol on the microflora of field grown wheat. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 617–624, 2002.
- BALDWIN, A. J. *et al.* Biogeography of aquatic microbes. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 41 p. 39–48, 2005.
- BALOWS, A. *et al.* **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria – Ecophysiology, Isolation, Identifications, Applications**, Springer - Verlag, Nova Iorque, 2. ed., 1992.
- BARRAQUIO, W. L. **In The Quest for Nitrogen Fixation in Rice**, IRRI, Los Banos, Philippines, p. 93–118, 2000.
- BERRY, A. J. The Natural History of West Malaysian Mangrove Faunas. **Malayan Nature Journal**, v. 25, p. 135–162, 1972.

BOSSIO, D. A. *et al.* Determinants of soil microbial communities: effects agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. **Microbial Ecology**, v. 36, p. 1–12, 1998.

BOTO, K. G.; WELLINGTON J. T. Soil characteristics and nutrient status in a northern Australian mangrove forest. **Estuaries**, v. 1, p. 61–69, 1984.

BRIMECOMBE, M. J.; DE LEIJ, F. A.; LYNCH, J. M. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. **The Rhizosphere – Biochemistry and Organic Substances at Soil - Plant Interface** (Pinton R, Varanini Z & Nannipieri P, eds), Marcel Dekker, Nova Iorque, p. 41–94, 2001.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T. *Biology of Microorganisms*, Prentice Hall International Inc, Londres, 5. ed., 1988

BURNS, L. A. Mangrove swamps. in J. R. Clark, editor. **Coastal ecosystem management**. Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Nova Iorque, p. 660-665, 1977.

BUYER, J. S., ROBERTS, D. P., RUSSEK-COHEN, E. Microbial community structure and function in the spermosphere as affected by soil and seed type. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 138–144, 1999.

CAMPOS, A. A. *et al.* **Zona costeira do Ceará: Diagnóstico para a gestão integrada**, Fortaleza: AQUASIS, 293 p., 2003.

CARDINALE, M. *et al.* Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.6147–6156, 2004.

CAVIGELLI, M. A.; ROBERTSON, G. P., The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. **Microbial Ecology**, v. 81, p. 1402–1414, 2000.

CILIA, V.; LAFAY, B.; CHRISTEN, R. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, p. 451-461, 1996.

CINTRON, G.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Factores abióticos. In: **Introducción a la ecología del manglar**. Unesco-Rostlac, p. 19-29, 1983.

CLARKE L. D., HANNON, N.J. The mangrove and salt marsh communities of the Sydney district. III. Plant growth in relation to salinity and waterlogging. **Journal of Ecology**, v. 58, p. 351 – 369, 1970.

CLARKE, P. J., ALLAWAY, A. J. The regeneration niche of the gray mangrove (*Avicennia marina*): effects of salinity, light and sediment factors on establishment, growth and survival in the field. **Oecologia**, v. 93, p. 548 - 556, 1993

CONAMA. Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente n. 312, de 10 de outubro de 2002. **Diário Oficial da União**, 2002.

COSTA, G. A. Análise das condições geoambientais do rio Pacoti-CE, In: I Congresso Intercontinental de Geociências. Fortaleza: **Anais do I Congresso Intercontinental de Geociências**, Eixo B, 8 p. 1 CD-ROM, 2004.

COSTA, R. *et al.* Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, p. 236–249, 2006.

CRUMP, C. B. *et al.* Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influence of bacterial growth and residence time. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1494–1505, 2004.

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

CUZZUOL, G. R. F.; CAMPOS A. Aspectos nutricionais na vegetação de manguezal do estuário do Rio Mucuri, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 227-234, 2001.

DUKE, N. C. *et al.* A world without mangroves? **Science**, v. 317, p. 41–42, 2007.

EICHNER, C. A. *et al.* Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 102-109, 1999.

FOLK, R. L.; WARD, W. C. Brazos River Bay: Study of the significance of grain size parameters. **Journal of Sedimentary Petrology**, v. 27, p. 3-27, 1957.

FUHRMAN, J.A. *et al.* Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 13104–13109, 2006.

GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, v. 309, p. 1387–1390, 2005.

GARBEVA, P., VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, p. 51–64, 2004.

GELSOMINO, A. *et al.* Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 38, p. 1–15, 1999.

GILL, A. M.; TOMLINSON, P. B. Studies on the growth of red mangrove (*Rhizophora*

*mangle* L.). 2. Growth and differentiation of aerial roots. **Biotropica**, v. 3, p. 63–77, 1972.

GIRVAN, M. S. *et al.* Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1800–1809, 2003.

GOMES, N. C. M. *et al.* Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, p. 96–109, 2008.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669–685, 2004.

HEATHCOCK, C. H. *et al.* Stereostucture of the Archaeobacterial C<sub>40</sub> Diol. **Science**, v. 229, p. 862–864, 1985.

HEWSON, I.; FUHRMAN, J. A. Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3425–3433, 2004.

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**, v. 33, p. 265–278, 2001.

HORWATH, W. R.; ELLIOTT, L. F.; LYNCH, J. M. Influence of soil quality on the function of inhibitory rhizobacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 87–92, 1998.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 18, p. 4765–4774, 1998.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. Metagenomics. **Nature**, v.455, p. 481–483, 2008.

HUTCHINGS, P.; SAENGER, P. **Ecology of Mangroves**. University of Queensland Press, St. Lucia, Austrália, 388 p., 1987.

JAEGER, C. H. *et al.* Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2685–2690, 1999.

JONES, D. A. Crabs of the mangal ecosystem. In **Hydrobiology of the Mangal** (Por, F. D.; Dor, I., eds). Dr. W. Junk Publishers, The Hague, p. 89–109, 1984.

KENNEDY, A. C.; SMITH, K. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant Soil**, v. 170, p. 75–86, 1995.

KJERFVE, B.; LACERDA, L. D. Mangroves of Brazil. In: Lacerda, L. D. (Ed.). **Conservation and sustainable utilization of mangrove forest in Latin America and Africa regions**. Okinawa: ITTO/ISME, cap 1, 272 p., 1993.

KRISTENSEN, E. *et al.* Carbon, nitrogen and sulfur cycling in sediments of the Ao Nam Bor mangrove forest, Phuket, Thailand: a review. **Phuket Marine Biological Center Research Bulletin**, v. 60, p. 37–64, 1995.

LACERDA, L. D.; MARINS, R. V. River damming and changes in mangrove distribution. **ISME /Glomis Electronic Journal**, v. 2, p. 1-4. 2002.

LATOUR X. *et al.* The establishment of an introduced community of fluorescent pseudomonads in the soil and in the rhizosphere is affected by the soil type. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 30, p.163–170, 1996.

LEE, S. Y. The ecological role of grapsid crabs in mangrove ecosystems: implications for conservation. **Marine and Freshwater Research**, v. 49, p. 335–343, 1998.

\_\_\_\_\_. Tropical mangrove ecology: Physical and biotic factors influencing ecosystem structure and function. **Australian Journal of Ecology**, v. 24, p. 355–366, 1999.

LEE S. Y. *et al.* Impact of urbanization on coastal wetland structure and function. **Austral Ecology**, v. 31, p. 149 – 163, 2006.

LILES, M. R. *et al.* A Census of rRNA Genes and Linked Genomic Sequences within a Soil Metagenomic Library. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 2684–2691, 2003.

LIU, W. T. *et al.* Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p.4516–4522, 1997.

LUPWAYI, N. Z.; RICE, W. A.; CLAYTON, G. W. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 30, p.1733–1741, 1998.

LOPEZ-PORTILLO, J; EZCURRA, E. Response of three mangroves to salinity in two geofoms. **Functional Ecology**, v. 3, p. 355–361, 1989.

LYNCH, J. M. **Introduction: some consequences of microbial competence for plant and soil.** In **The Rhizosphere** (ed. Lynch, J. M.), John Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido, p. 1–10, 1990.

MACINTOSH, D. J. Ecology and productivity of Malaysian mangrove crab populations (Decapoda: Brachyura). In **Proceedings of the Asian Symposium on Mangrove Environment, Research and Management** (Soepadmo, E., Rao, A. N. & Macintosh, D. J., eds). University of Malaya e UNESCO, 1984.

MACNAE, W. A general account of the flora and fauna of mangrove swamps in the Indo-Pacific region. **Advances in Marine Biology**, v. 6, p. 73 – 270, 1968.

MARSCHNER, P. *et al.* Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 1437–1445, 2001.

MCKEE, K. L. Soil physicochemical patterns and mangrove species distribution - reciprocal effects? **Journal of Ecology**, v. 81, p. 477-487, 1993.

MENDES, L. W. **Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso-SP**. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 141 p., 2009.

MORROW, L.; NICKERSON, N. H. Salt concentrations in ground waters beneath *Rhizophora mangle* and *Avicennia germinans*. **Rhodora**, v. 75, p. 102–106, 1973.

MURRAY, A. E.; HOLLIBAUGH, J. T.; ORREGO C. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2676–2680, 1996.

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

NAKATSU, C. H. Microbial community analysis. In D. Hillel et al. (ed.) **Encyclopedia of soils in the environment**. Elsevier, Oxford, Reino Unido, p. 455–463, 2004.

\_\_\_\_\_. Soil Microbial Community Analysis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Soil Science Society of America Journal**, v. 71, n. 2, p. 562–571, 2007.

NAKATSU, C. H.; TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. **Soil Science Society of America Journal**, v. 64, p. 1382–1388, 2000.

NICKERSON, N. H., THIBODEAU F. R. Association between pore water sulfide concentrations and the distribution of mangroves. **Biogeochemistry**, v. 1, p. 183–192, 1985.

NOGUEIRA, V. L. R. *et al.* Análise da Diversidade Bacteriana de Manguezal da Costa Cearense por Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE). **Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2009.

NÜBEL, U., *et al.* Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5636-5643, 1996.

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

ODUM, W. E.; HEALD, E. J. Trophic analysis of an estuarian mangrove community.



**Bulletin of Marine Science**, v. 22, p. 671–738, 1972

OGUNSEITAN, O. **Microbial Diversity**. Blackwell Science Ltd., Oxford, Reino Unido, 292 p., 2005.

OLSEN, G. J. *et al.* Microbial Ecology and Evolution: a Ribosomal RNA Approach. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 337-365, 1986.

ØVREÅS L.; TORSVIK V. Microbial Diversity and Community Structure in Two Different Agricultural Soil Communities. **Microbial Ecology**, v. 36, p. 303–315, 1998.

ØVREÅS, L. *et al.* Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake Sælenvannet, as Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3367–3373 1997.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, p. 734–740, 1997.

PACE, N. R. *et al.* The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, v. 9, p. 1–55, 1986.

PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. **The Rhizosphere: Biodiversity and Organic Substances at the Soil–Plant Interface**, Marcel Dekker, Nova Iorque, 2001.

PURVES, W. K. *et al.* Vida A Ciência da Biologia, Artmed, Rio Grande do Sul, 6. ed., 2002.

RAINEY, F. A. *et al.* *Clostridium paradoxum* DSM 7308(T) contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. **Microbiology**, v. 142, p. 2087-2095, 1996.

RANJARD, L. *et al.* Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). **Microbial Ecology**, v.39, p.263–272, 2000.

RASCHE, F. *et al.* Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared to the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, p.219–235, 2006.

ROBERTSON, A.; DUKE, N. C. Mangroves as nursery sites: comparisons of the abundance and species composition of fish and crustaceans in mangroves and other nearshore habitats in tropical Australia. **Marine Biology**, v. 96, p. 193–205, 1987.

ROCHA, L. L. **Estudo de Comunidades Bacterianas de Solos do Manguezal da Barra Grande, Icapui-CE e Seleção de Cepas com Potencial para Degradar Hidrocarbonetos**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 87 p., 2008.

RODRIGUEZ, G. Structure and production in neotropical mangroves. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 2, p. 264–267, 1987.

SAENGER, P. Mangrove Ecology. **Silviculture and Conservation**. Kluwer, Dordrecht, 2002.

SALLES, J. F.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: effect of crop and land use history. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4012–4020, 2004.

SASEKUMAR, A. The distribution of macrofauna on a Malayan mangrove shore. **Journal of Animal Ecology**. v. 43, p. 51–69, 1974.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezais brasileiros: região sudeste-sul. In: Simpósio sobre Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste: Síntese dos Conhecimentos, São Paulo. **Anais do Simpósio sobre Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste: Síntese dos Conhecimentos**, p. 78, 1989a.

\_\_\_\_\_. Perfil dos Sistemas Litorâneos Brasileiros, com Especial Ênfase Sobre o Ecossistema Manguezal. **Publicação Especial do Instituto de Oceanografia de São Paulo**, v. 7, p.1-16, 1989b.

\_\_\_\_\_. Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. São Paulo, **Caribbean Ecological Research**, p. 7, 1995.

SCHAEFFER-NOVELLI Y.; CINTRON, G. Status of mangrove research in Latin America and the Caribbean. **Boletim do Instituto de Oceanografia**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 93-97, 1990.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; LIMA-MESQUITA, H. S.; CINTRON-MOLERO, G. The Cananea lagoon estuarine system, SP. Brazil. **Estuaries**, v. 13, n. 2, p.193-203, 1990.

SCHMIDT, T. M. The Maturing of Microbial Ecology. **International Microbiology**, v. 9, p. 217-223, 2006.

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

SCHÖNFELD, J. *et al.* Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 40, p. 29–37, 2002.

SCHULTE, E. E.; HOPKINS, B. G. Estimation of soil organic matter by weight loss-on-ignition. In: MAGDOFF, F. R.; TABATABAI, M.A.; HANLON Jr., E. A. **Soil organic matter: Analysis and interpretation**. Madison, p. 21-31, 1996.

SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**. v.64, p.4870–4876, 1998.

SERVAIS, P., *et al.* Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid

content. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 33, p. 41–51, 2003.

SESSITSCH, A. *et al.* Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4215–4224, 2001.

SMITH, T. J. Seed predation in relation to tree dominance and distribution in mangrove forests. **Ecology**, v. 68, p. 266–273, 1987.

SMITH, T. J. *et al.* Keystone species and mangrove forest dynamics: the influence of burrowing by crabs on soil nutrient status and forest productivity. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 33, p. 19–32, 1991.

SPALDING, M.; BLASCO, F.; FIELD, C. World mangrove atlas. Okinawa: **International Society for Mangrove Ecosystems**, 178 p., 1997.

SOTO, R.; JIMÉNEZ, J. A. Análisis fisionómico estructural del manglar de Puerto Soley, La Cruz, Guanacaste, Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v. 30, p. 161-168, 1982.

SOUZA FILHO P. W. M.; MARTINS, E. S. F.; COSTA F. R. Using mangroves as geological indicator of coastal changes in the Bragança macrotidal flat, Brazilian Amazon: an approach from remote sensing data and GIS. **Ocean and coastal management**, v. 49, p. 462–475, 2006.

STERN, W. L.; VOIGT G. K. Effect of salt concentration on growth of red mangrove in culture. **Botanical Gazette**, v. 121, p. 36–39, 1959.

TAKIZAQA, M.; COLWELL, R. R.; HILL, R. T. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 997-1002, 1993.

TOMLINSON, P. B. **The botany of mangroves**. Cambridge University Press, Cambridge, 1986.

TORSVIK, V.; SORHEIM R.; GOKSOYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities: A review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 170–178, 1996.

TORSVIK, V. *et al.*, Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, v. 64, p. 53–62, 1998.

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

TWILLEY, R. R. Coupling of mangroves to the productivity of estuarine and coastal waters. In: Jansson, B.O. (Ed.), Coastal – Offshore Interactions, **Lecture Notes on Coastal and Estuarine Studies**, Springer, Berlin, v. 22., p. 155–180, 1988.

URAKAWA, H. *et al.* Characterization of depth-related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinone

profiling. **Environmental Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 542-554, 2000.

VALLAEYS, T. *et al.* Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 24, p. 279-285, 1997.

VANNUCCI M. **Os manguezais e nós**, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2. ed., 244 p., 2002.

VIEIRA, R.P. *et al.* Archaeal communities in a tropical estuarine ecosystem: Guanabara Bay, Brazil. **Microbial Ecology**, v. 54, n. 3, p. 460 – 468, 2007.

VORONEY, R. P. The Soil Habitat. In: **Soil Microbiology and Biochemistry**. Paul E. A. (Ed.), Elsevier, Oxford, Reino Unido, 3. ed., p. 25-49, 2007.

WALSH, D. A.; PAPKE, R. T.; DOOLITTLE, W. F. Archaeal diversity along a soil salinity gradient prone to disturbance. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 1655–1666, 2005.

WANG, Y.; HONG, K. Effects of soil factors on microbe distributions in mangrove soil. **Chinese Journal of Tropical Crops**, v. 26, n. 3, p. 109-114, 2005.

WAWER, C. *et al.* A simple and rapid electrophoresis method to detect sequence variation in PCR-amplified DNA fragments. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p.4928–4929, 1995.

WENTWORTH, C. K. A scale of grade and class term for clastic sediments. **Journal of Geology**, v. 30, p. 377-392, 1922.

WOESE, C. R. The *Archaea*: Their History and Significance. In Kates, M.; Kushner D. J.; Matherson (Eds.) **The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)**. Elsevier, Amsterdam, p. 7-29, 1993.

WOESE, C. R.; KANDLER O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.

WORLD RESOURCES INSTITUTE. **World Resources 1996-7**. WRI, UNEP, UNDP, World Bank, 1996.

WU, R.W. Studies in the microbial flora of the Tansui River Mangrove forest. **Inst. Bot., Acad. Sinia Monograph Ser.**, v. 13, p. 303-317, 1993.

ZHANG, Y. *et al.* Bacterial community structure of mangrove sediments in relation to environmental variables accessed by 16S rRNA gene-denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. **Scientia Marina**, v. 73, n. 3, p. 487-498, 2009.

ZILLIG, W. Comparative Biochemistry of *Archaea* and *Bacteria*. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 1, p. 544-551, 1991.