

GEÓRGIA BARGUIL COLARES

ECOLOGIA MICROBIANA EM SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS DO ESTADO DO
CEARÁ

Tese 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 a obtenção do grau de Doutor em Ciências Marinhas Tropicais

Área de Concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Rui Simões de Menezes

C649e Colares, Geórgia Barguil.

Ecologia microbiana de sedimentos de manguezal do Estado do Ceará / Geórgia Barguil
Colares. – 2014.

162p.: il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Vânia Maria Maciel Melo.

1. Manguezais – Ceará. 2. Bactérias. I. Título.

CDD 571.629

Aos meus amores, à minha família.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, profa. Vânia Melo, por todas as oportunidades, confiança, apoio, conselhos, conversas e repreensões ao longo desses vários anos de trabalho. Sou e serei eternamente grata por tudo.

Às professoras Cristina Almeida Rocha Barreira, Lidianne Leal Rocha, Rossana de Aguiar Cordeiro e Suzan Pantaroto de Vasconcellos, membros da banca de avaliação deste trabalho, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições. À Lidianne, em especial, também pelos anos de convivência, amizade e exemplo de superação.

A todos os atuais, temporários, antigos e eternos membros do LEMBitech. Ter amigos, ajuda e cooperação no dia-a-dia é fundamental, e todos vocês foram partes importantes na execução deste trabalho. Não poderia deixar de mencionar as queridas Bárbara Cibelle, Natália Falcão, Vanessa Câmara e Wal Melgaço pelo empenho em enviar minhas amostras para os Estados Unidos.

A todos os meus colegas e amigos no Argonne National Laboratory, principalmente ao prof. Jack Gilbert pela oportunidade e disponibilidade em me receber e me orientar durante a minha estadia em seu laboratório. À minha querida Iratxe Zarraonaindia pela companhia, amizade e ajuda sempre que precisei.

À profa. Janet Jansson e sua equipe no Lawrence Berkeley National Laboratory pelo armazenamento das minhas amostras, recepção no laboratório e ajuda nas extrações de DNA. Agradeço também a Ulisses Nunes por todo o apoio no breve tempo em que lá estive e pela amizade.

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

Ao Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC), seus funcionários e à Dra. Tecia Vieira Carvalho por permitir o uso do agitador elétrico de peneiras para a realização das análises granulométricas deste trabalho.

A todos aqueles que me ajudaram nas árduas coletas deste trabalho, o apoio de vocês jamais será esquecido, bem como o de Patrícia Claro do ICMBio, Heleno dos Santos do IBAMA e ao Sr. Sales pela disponibilidade em sempre nos levar de barco até o manguezal do Timonha.

Aos analistas ambientais do IBAMA, Lívio Gurjão e Joeliton Bezerra, por terem me ajudado com a licença para enviar as amostras para o exterior.

Aos meus pais, pelo apoio inabalável em todas as decisões que tomei ao longo da vida, me provando que somente amor de pai e mãe é incondicional e eterno.

Ao Instituto de Ciências do Mar – Labomar, seus professores e funcionários por esses enriquecedores anos de pós-graduação e aos meus amigos e colegas de turma de mestrado e doutorado Elthon Ferreira, Hortência Barroso e Tallita Tavares pela convivência, parceria e troca de experiências.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fulbright pelo apoio financeiro.

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

“Fui levado a reservar, até hoje, a maior parcela de minha ternura para a sociedade dos mangues - a sociedade dos caranguejos e dos homens, seus irmãos de leite, ambos filhos da lama”. (Josué de Castro)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 O Ecossistema Manguezal.....	19
2.1.1 Distribuição e impactos.....	19
2.1.2 Vegetação.....	21
2.1.3 Ciclagem de nutrientes e micro-organismos em sedimentos de manguezais.....	25
2.1.4 Métodos de estudo de micro-organismos.....	31
2.1.5 Estudos de ecologia microbiana em sedimentos de manguezais do Brasil – Domínios Archaea e Bacteria.....	41
2.1.5.1 Bacteria.....	43
2.1.5.2 Archaea.....	46
2.1.5.3 Interações plantas e micro-organismos.....	48
3 OBJETIVOS.....	50
3.1 Objetivos Gerais.....	50
3.2 Objetivos Específicos.....	50
CAPÍTULO 1 - Estrutura das comunidades de bactérias e arqueias em sedimentos da zona de raiz de <i>Rhizophora mangle</i> no manguezal do Rio Pacoti, Ceará: Uma série temporal de 5 anos.....	51
1.1 INTRODUÇÃO.....	52
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
1.2.1 Área de estudo e coleta do sedimento.....	53
1.2.2 Análises físico-químicas dos sedimentos.....	55
1.2.3 Extração de DNA.....	55
1.2.4 PCR-DGGE.....	56
1.2.5 Análise dos dados.....	57
1.3 RESULTADOS.....	58
1.4 DISCUSSÃO.....	71

1.5 CONCLUSÃO.....	75
CAPÍTULO 2 - Estrutura das comunidades de bactérias e arqueias em sedimentos de 5 manguezais do estado do Ceará.....	77
2.1 INTRODUÇÃO.....	78
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	79
2.1.1 Áreas de estudo.....	79
2.2.2 Amostragem.....	82
2.2.3 Análise dos sedimentos.....	82
2.2.4 Extração de DNA, PCR – DGGE e Análise dos Dados.....	82
2.3 RESULTADOS.....	82
2.4 DISCUSSÃO.....	97
2.5 CONCLUSÃO.....	102
CAPÍTULO 3 – Estudo da diversidade procariótica de sedimentos de 5 manguezais através de sequenciamento em larga escala.....	103
3.1 INTRODUÇÃO.....	104
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	105
3.2.1 Áreas de estudo.....	105
3.2.2 Amostragem.....	105
3.2.3 Extração de DNA e sequenciamento.....	105
3.2.4 Análise dos dados.....	106
3.3 RESULTADOS.....	107
3.3.1 Composição taxonômica da microbiota de sedimentos de 5 manguezais do Ceará.....	107
3.3.2 Índices de alfa diversidade.....	109
3.3.3 Beta diversidade.....	110
3.3.4 Análises de similaridade.....	112
3.3.5 Análise de variância (ANOVA).....	115
3.3.6 Composição e alfa diversidade de Archaea.....	122
3.4 DISCUSSÃO.....	125
3.5 CONCLUSÃO.....	133
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	134

REFERÊNCIAS.....	137
APÊNDICE.....	158

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AOA	Arqueias Oxidadoras de Amônio
AOB	Bactérias Oxidadoras de Amônio
ARDRA	Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado
ARISA	Análise Automatizada do Espaço Intergênico Ribossômico
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
EMP	Earth Microbiome Project
ha	Hectare
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
LEMBiotech	Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia
N	Nitrogênio
P	Fósforo
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PERMDISP	Permutational Analysis of Multivariate Dispersions
PPI	Perda de Peso por Ignição
PVC	Policloreto de Vinila
PyNASt	Python Nearest Alignment Space Termination
QIIME	Quantitative Insights into Microbial Ecology
RDA	Análise de Redundância
RISA	Análise de Espaçador Intergênico Ribossômico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
T-RFLP	Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos Terminais de Restrição
UPGMA	Associação Média Não Ponderada
UTO	Unidade Taxonômica Operacional

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Visão geral dos principais métodos independentes de cultivo usados em ecologia microbiana.....	34
Tabela 2 – Comparativo entre o sequenciamento de Sanger e as diversas plataformas de sequenciamento de nova geração.....	37
Tabela 3 – Estudos em ecologia microbiana em sedimentos de manguezal do Brasil....	42
Tabela 1.1 – Média de chuvas no município de Aquiraz entre os anos de 2007 – 2012.....	53
Tabela 1.2 – Variáveis ambientais dos pontos e períodos de coleta e características gerais dos sedimentos.....	58
Tabela 1.3 – Riqueza de ribotipos de Bacteria detectados por DGGE.....	61
Tabela 1.4 – Riqueza de ribotipos de Archaea detectados por DGGE.....	61
Tabela 1.5 – Efeitos de variáveis ambientais sobre a comunidade de Bacteria em sedimentos do manguezal do Pacoti ao longo dos 5 anos por Análise de Redundância (RDA).....	69
Tabela 1.6 – Efeitos de variáveis ambientais sobre a comunidade de Archaea em sedimentos do manguezal do Pacoti ao longo dos 5 anos explicados por Análise de Redundância (RDA).....	70
Tabela 2.1 – Algumas características das áreas de estudo e os principais impactos aos quais estão submetidos.....	81
Tabela 2.2 – Variáveis ambientais e características dos sedimentos dos cinco manguezais estudados.....	84
Tabela 2.3 – Riqueza de ribotipos de Bacteria baseada na análise das matrizes de presença e ausência derivadas de análises de géis de DGGE.....	92
Tabela 2.4 – Riqueza de ribotipos de Archaea baseada na análise das matrizes de presença e ausência derivadas de análises de géis de DGGE.....	93
Tabela 2.5 – Efeitos de variáveis ambientais sobre a comunidade de Bacteria em sedimentos de manguezais explicados por Análise de Redundância (RDA).....	95
Tabela 2.6 – Efeitos de variáveis ambientais sobre a comunidade de Archaea em sedimentos de manguezais explicados por Análise de Redundância (RDA).....	96

Tabela 3.1 – Índices de alfa diversidade relativos às sequências recuperadas em 5 manguezais do Ceará.....	109
Tabela 3.2 – Valores de p obtidos pelo teste PERMDISP para cada manguezal usando a distância UniFrac ponderada.....	115
Tabela 3.3 – Valores de p obtidos pelo teste PERMDISP para cada ponto nos manguezais usando a distância UniFrac ponderada.....	116
Tabela 3.4 – ANOVA mostrando os gêneros nos quais houve diferença significativa na abundância relativa entre os manguezais.....	118
Tabela 3.5 – ANOVA mostrando os gêneros nos quais houve diferença significativa na abundância relativa entre os pontos de coleta nos manguezais.....	120
Tabela 3.6 – Abundância dos filos de Archaea nos manguezais estudados.....	124
Tabela 3.7 – Abundância dos filos de Archaea em cada ponto nos manguezais estudados.....	124
Tabela 3.8 – Abundância relativa dos gêneros de Archaea nos manguezais.....	125
Tabela 3.9 – Índices de alfa diversidade de Archaea nos manguezais.....	127
Tabela 3.10 – Índices de alfa diversidade de Archaea dos pontos nos manguezais estudados.....	127

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Extensão (ha) dos manguezais no mundo.....	19
Figura 2 – Adaptações morfofisiológicas dos mangues.....	22
Figura 3 – Representação esquemática dos ciclos do enxofre, carbono e nitrogênio...	27
Figura 4 – Representação esquemática das etapas dos métodos moleculares (independentes de cultivo).....	33
Figura 5 – Representação esquemática do princípio tecnológico da plataforma Illumina.....	39
Figura 1.1 – Localização dos pontos de coleta no manguezal do Rio Pacoti – CE.....	54
Figura 1.2 – Análise de PCA mostrando a variabilidade dos dados ambientais nas 30 amostras de sedimentos do manguezal do Pacoti, Ceará.....	60
Figura 1.3 – Agrupamentos em função das estruturas de comunidades de bactérias obtidas a partir dos perfis de DGGE utilizando o algoritmo UPGMA e a distância de Jaccard ao longo dos 5 anos.....	62
Figura 1.4 – Agrupamentos em função das estruturas de comunidades de arqueias obtidas a partir dos perfis de DGGE utilizando o algoritmo UPGMA e a distância de Jaccard ao longo dos 5 anos.....	65
Figura 2.1 – Mapa da costa cearense com destaque para os municípios onde foram feitas as amostragens.....	80
Figura 2.2 – Ordenação das variáveis ambientais em função da Análise de Componentes Principais (PCA) para sedimentos de cinco manguezais do Ceará: Pacoti, Ceará, Acaraú, Coreaú e Timonha.....	87
Figura 2.3 – Agrupamentos de manguezais em função das estruturas de comunidades de bactérias obtidas a partir dos perfis de DGGE utilizando o algoritmo UPGMA e a distância de Jaccard.....	88
Figura 2.4 – Agrupamentos de manguezais em função das estruturas de comunidades de arqueias obtidas a partir dos perfis de DGGE utilizando o algoritmo UPGMA e a distância de Jaccard.....	90
Figura 3.1 – Distribuição dos principais filos nos 5 manguezais estudados.....	107
Figura 3.2 – Distribuição de classes de Proteobacteria nos manguezais estudados.....	108

Figura 3.3 – Distribuição dos filós em cada um dos pontos nos manguezais estudados.....	109
Figura 3.4 – Análise de coordenadas principais (PCoA) em 3 dimensões usando a distância UniFrac ponderada mostrando a dispersão das amostras dos 5 manguezais.	110
Figura 3.5 – Análise de coordenadas principais (PCoA) usando a distância UniFrac ponderada mostrando a dispersão das amostras em cada um dos pontos nos 5 manguezais.....	111

RESUMO

Os manguezais são ecossistemas costeiros produtivos encontrados em regiões de clima tropical e subtropical, tendo o Brasil a segunda maior área de manguezal do mundo e a maior do continente americano. Embora a macro ecologia desses ambientes seja bastante conhecida, pouco se sabe sobre a comunidade microbiana. O objetivo deste trabalho foi contribuir para o avanço do conhecimento da ecologia microbiana de sedimentos de manguezais, através de uma varredura em manguezais do estado do Ceará (Pacoti, Ceará, Coreaú e Acaraú) submetidos a diferentes tipos de impactos, tendo um manguezal pristino (Timonha) como referência. Um dos estudos envolveu o monitoramento durante 5 anos da estrutura da comunidade microbiana de sedimentos em zonas de raízes de *Rhizophora mangle* no manguezal do Pacoti. Uma segunda abordagem abrangeu um estudo biogeográfico das comunidades microbianas em sedimentos sem vegetação e em zonas de raízes de *R. mangle* e *Avicennia shaueriana* nos cinco manguezais. Esses dois estudos foram feitos usando a técnica de PCR-DGGE e análises de variáveis ambientais e suas correlações. A última abordagem buscou caracterizar a diversidade taxonômica dos cinco manguezais através do sequenciamento em larga escala. O resultado de cinco anos de monitoramento das comunidades de bactérias e arqueias mostrou variação na estrutura dessas comunidades e que esta foi em maior parte explicada pelo conteúdo de silte-argila. A riqueza de ribotipos para Bacteria e Archaea variou de 10 a 29 e de 14 a 38, respectivamente, sendo a região mais distante do mar a que apresentou menor média de riqueza para ambos os domínios. No estudo biogeográfico, a estrutura das comunidades de Bacteria e Archaea foi, em grande parte, explicada pelo conteúdo de silte-argila, mas também pela espécie de mangue, já que os sedimentos das áreas vegetadas foram mais similares entre si do que com os sedimentos de áreas sem vegetação. Os cinco manguezais diferiram com relação à riqueza de micro-organismos, sendo o manguezal do Pacoti o que apresentou a segunda maior riqueza de bactérias e a menor de arqueias. Ao analisar a riqueza por habitat, a área sem vegetação apresentou menor riqueza de bactérias, principalmente nos manguezais impactados pela carcinicultura. Quanto à diversidade taxonômica, foi detectada a predominância do filo Proteobacteria nos manguezais, com exceção do Pacoti, que apresentou maior abundância de Firmicutes. Entre os filios mais abundantes também se encontram Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi e Planctomycetes. As classes de Proteobacteria mais abundantes nos cinco manguezais foram Gamma, Delta, Alpha e Epsilonproteobacteria. Foram detectados apenas dois filios de Archaea nos cinco manguezais, Crenarchaeota e Euryarchaeota. O manguezal do rio Ceará se destacou por apresentar alguns gêneros exclusivos de Archaea, incluindo *Halobacterium*, *Natrococcus* e *Thermogymnomonas*. Esse primeiro conjunto de dados para manguezais do Nordeste do Brasil demonstra claramente a existência de padrões de estruturas de comunidades de Bacteria e Archaea, padrões esses moldados principalmente pelo conteúdo de silte-argila e tipo de habitat. Sete filios de Bacteria e dois de Archaea dominam esses manguezais. Essa composição basal de filios por sua vez, compreende uma extensa diversidade de gêneros que distingue cada manguezal e sinaliza para uma alta redundância funcional. Essa complexa diversidade microbiana responde pelo funcionamento e contribui para a reconhecida resiliência desses ecossistemas, ressaltando a importância de sua conservação.

Palavras-chave: Bactéria, arqueia, diversidade, DGGE, sequenciamento

ABSTRACT

Mangroves are highly productive coastal ecosystems found in tropical and subtropical climates, with Brazil having the second largest mangrove area in the world and the largest in the Americas. Although the macro ecology of these environments is well known, little is known about the microbial community. The objective of this study was to contribute to the knowledge of the microbial ecology of mangrove sediments investigating mangroves of the state of Ceará (Pacoti, Ceará, Coreaú and Acaraú) subjected to different types of impacts, having a pristine mangrove (Timonha) as a reference. One of the studies involved a five-year monitoring of the microbial community structure in the sediment in the root zones of *Rhizophora mangle* in Pacoti mangrove. A second approach comprised a biogeographic study of microbial communities in sediments without vegetation and in the root zones of *R. mangle* and *Avicennia shaueriana* in five mangroves. These two studies were performed using PCR- DGGE and analyses of environmental variables and their correlations. The last approach sought to characterize the taxonomic diversity of the five mangroves using high-throughput sequencing. The results of the five-year monitoring of bacteria and archaea showed variation in the structure of these communities, and this variation was mostly explained by the silt-clay contents. The ribotype richness for Bacteria and Archaea ranged from 10-29 and 14-38, respectively, and the site most distant to the sea presented the lowest average richness for both domains. In the biogeographic study the structure of bacterial and archaeal communities was largely explained by the silt-clay contents, but also by the mangrove species, since the sediments of vegetated areas were more similar to each other than with the unvegetated sediments. The five mangroves differed regarding to the microorganism richness, with Pacoti having the second highest richness of bacteria and the lowest of archaea. By analyzing the richness in the habitats, the unvegetated area showed lower bacterial richness, especially in the mangroves impacted by shrimp farming. Regarding the taxonomic diversity the predominance of the phylum Proteobacteria in the mangroves was detected, with the exception of Pacoti, which showed higher abundance of Firmicutes. Among the most abundant phyla Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi and Planctomycetes were also detected. The most abundant classes of Proteobacteria in the five mangroves were Gamma, Delta, Alpha and Epsilonproteobacteria. Only two phyla of Archaea were detected in the five mangroves, Crenarchaeota and Euryarchaeota. Interestingly, Ceará mangrove exhibited some unique genera of archaea, including *Halobacterium*, *Natrococcus* and *Thermogymnomonas*. This first dataset for northeast Brazil mangroves clearly demonstrates the existence of structural patterns of the communities of Bacteria and Archaea and these patterns were molded primarily by the silt-clay contents and habitat type. Seven phyla of Bacteria and two of Archaea dominate these mangroves. This basal phyla composition comprises a wide range of genera that distinguishes each mangrove and signals for a high functional redundancy. This complex microbial diversity is responsible for the mangrove functioning and contributes to the resilience of these ecosystems, emphasizing the importance of their conservation.

Keywords: Bacteria, archaea, diversity, DGGE, high-throughput sequencing

1 INTRODUÇÃO

O manguezal é um ecossistema particular, restrito às zonas entremarés do litoral e ilhas das regiões tropicais e subtropicais, associado a estuários, baías e lagunas e em locais protegidos dos impactos das ondas (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1990). No Brasil encontra-se a segunda maior área de manguezais do mundo, abrangendo um total de 13.000 Km² (SPALDING; KAINUMA; COLLINS, 2010). Devido ao reconhecimento de sua importância e para protegê-los legalmente dos constantes impactos aos quais estão submetidos, os manguezais foram considerados áreas de preservação permanente pela Constituição Federal de 1988. Há também leis nas esferas estaduais e municipais de proteção dessas áreas (SCHAEFFER-NOVELLI; CINTRÓN-MOLERO, 1994).

Os manguezais possuem espécies vegetais adaptadas a condições de alta salinidade, depleção de oxigênio e à dinâmica das marés. A comunidade associada aos manguezais é composta por bactérias, fungos, microalgas, invertebrados, pássaros e mamíferos. Porém, apesar de sua grande importância, pouco ainda se sabe sobre a diversidade microbiana nesse ecossistema, tornando imperativo o conhecimento do papel dos micro-organismos nos manguezais (THATOI *et al.*, 2013).

Durante muitos anos o estudo dos micro-organismos esteve limitado pelas técnicas dependentes de cultivo, as quais subestimam a real diversidade microbiana nos ambientes naturais (SCHMIDT, 2006). O advento das técnicas moleculares permitiu que grande parte da diversidade de micro-organismos fosse acessada, auxiliando os estudos de ecologia microbiana (PACE; OLSEN; WOESE, 1986). Apesar disso, ainda há muitas lacunas no conhecimento do mundo microbiano, especialmente em sedimentos de manguezais (GOMES *et al.*, 2008).

Diante deste cenário, este estudo teve como foco contribuir para expandir o conhecimento acerca da diversidade e estrutura da comunidade microbiana de sedimentos de manguezais.

O primeiro capítulo desta tese foi dedicado ao estudo da estrutura e padrão de distribuição das comunidades de bactérias e arqueias de sedimentos na zona de raiz de *Rhizophora mangle* dentro do manguezal do Rio Pacoti, zona leste da costa cearense, que vem sofrendo alterações ambientais decorrentes do intenso barramento do rio. Esse estudo discute o resultado de cinco

anos de monitoramento que teve o intuito de verificar que fator(es) teria(m) maior efeito sobre a comunidade microbiana.

O segundo capítulo aborda a estrutura da comunidade microbiana em escala regional, sendo incluídos na análise cinco manguezais, quatro impactados (Pacoti, Ceará, Acaraú, Coreaú) e um pristino (Timonha). O objetivo desse estudo foi descrever a distribuição geográfica da comunidade microbiana em manguezais e os fatores que a governam.

O terceiro capítulo descreve a composição taxonômica da comunidade microbiana baseada em dados de sequenciamento em larga escala de amostras de DNA de sedimentos dos mesmo cinco manguezais do capítulo anterior, com o objetivo de contribuir para o inventário da diversidade microbiana de manguezais do Brasil.

Ao final, foram feitas considerações gerais sobre o avanço e as contribuições trazidas por esta tese à ecologia microbiana de manguezais.

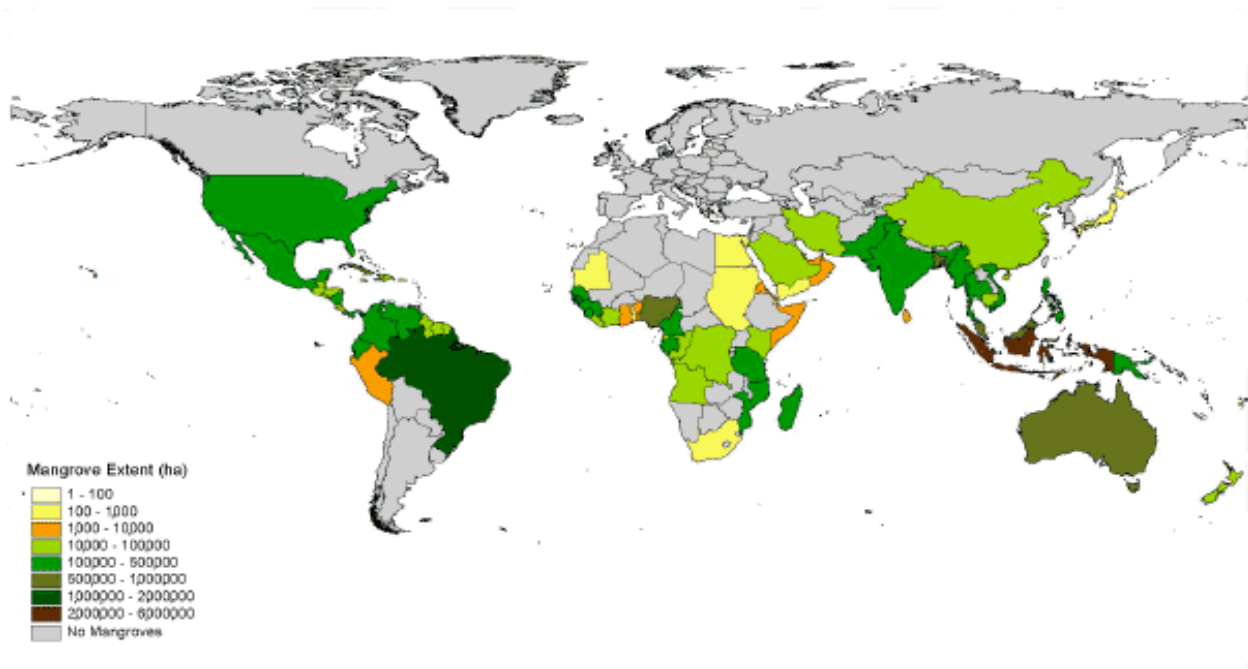
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Ecossistema Manguezal

2.1.1 Distribuição e impactos

Os manguezais são ecossistemas costeiros encontrados em regiões de clima tropical e subtropical, cobrindo uma área de 150.000 Km² distribuídos em 123 países (FIGURA 1). O Brasil possui a segunda maior área de manguezal do mundo e a maior do continente americano, com 13.000 Km², o que corresponde a 8,5% do total mundial (SPALDING; KAINUMA; COLINS, 2010). Ao longo da vasta área de manguezal do país, que se estende desde o Amapá até a cidade de Laguna, em Santa Catarina (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1990) há grandes contrastes em termos de produtividade, hidrodinâmica e impactos antrópicos (LACERDA, 2002).

Figura 1 – Extensão (ha) dos manguezais no mundo. A região em marrom representa a maior área de manguezal do mundo, na Indonésia, enquanto o verde escuro representa a segunda maior área de manguezal do mundo, no Brasil (FAO, 2004).



Os seguintes fatores são considerados os principais determinantes da distribuição dos manguezais no mundo:

1) Clima. Os manguezais são ecossistemas tropicais e não são tolerantes a temperaturas congelantes. Seus limites latitudinais variam de acordo com as temperaturas do ar e da água (TOMLINSON, 1986). A ocorrência dos manguezais também é afetada pela aridez e o seu desenvolvimento é muito maior ao longo das costas que têm alta pluviosidade (MACNAE, 1969).

2) Salinidade. A alta salinidade geralmente não é uma exigência para o crescimento, uma vez que a maioria dos manguezais pode crescer em água doce (TOMLINSON, 1986). No entanto, eles não se desenvolvem em habitats estritamente de água doce por conta da competição com as espécies típicas deste habitat. A salinidade é, deste modo, importante para a eliminação de outras espécies de plantas vasculares que não estão adaptadas para crescimento em habitats com alta salinidade.

3) Flutuação das marés. A influência das marés também não é um requisito, mas desempenha um papel indireto importante:

a. A inundação com água salgada ajuda a excluir a maioria das outras plantas vasculares e reduz a competição;

b. As marés trazem água salgada até estuários contra a saída de água doce e ampliam o desenvolvimento de manguezais no interior;

c. As marés fazem o transporte de sedimentos, nutrientes e água limpa para o ambiente de mangue e exportam carbono orgânico e compostos de enxofre reduzido;

d. Onde a evaporação é elevada, as marés ajudam a lavar os sedimentos e diminuir da salinidade.

4) Sedimentos e energia das ondas: Manguezais crescem melhor em ambientes de deposição, com baixa energia de ondas de acordo com Tomlinson (1986). Ondas altas evitam o estabelecimento de propágulos, expõem os sistemas de raízes e não permitem o acúmulo de sedimentos finos.

Os manguezais do Brasil apresentam diferenças em suas regiões. A região Norte, a qual possui 85% da área total de manguezais do país, tem as maiores e mais complexas florestas de manguezais. Essas florestas podem chegar até a 40Km continente adentro, seguindo o curso do rio, com árvores que chegam a ter 1m de diâmetro e 40m de altura. Na costa Nordeste, as

florestas de manguezais são menos complexas, com árvores chegando a 20m de altura e florestas que se desenvolvem geralmente como franjas estreitas ao longo de estuários, lagos e deltas. Esta região possui 10% da área total de manguezais no Brasil. Na região sudeste, a qual possui somente 5% da área total de manguezal do país, os manguezais estão restritos ao interior de baías e são compostos por árvores que raramente excedem 10m de altura (LACERDA, 2002).

A localização geográfica, entretanto, não é a única diferença entre os manguezais brasileiros. O tipo e severidade dos impactos aos quais esses ecossistemas estão submetidos também varia entre as regiões. A maioria dos manguezais brasileiros ainda está intacta, particularmente os da região norte, onde a densidade demográfica é menor. Por outro lado, nas regiões nordeste e sudeste, onde os manguezais são menos complexos, as altas densidades demográficas impuseram uma grande pressão de impactos antropogênicos, decorrentes da urbanização e industrialização, especialmente na região sudeste, e atividades de turismo e carcinicultura, além da urbanização, na região nordeste (LACERDA, 2002).

Devido a sua reconhecida importância e por serem ecossistemas ameaçados, os manguezais são considerados no Brasil como áreas de preservação permanente (APP), incluídos em diversos dispositivos constitucionais (Constituição Federal e Constituições Estaduais) e infraconstitucionais (leis, decretos, resoluções, convenções). A observação desses instrumentos legais impõe uma série de ordenações do uso e/ou de ações em áreas de manguezais (SCHAEFFER-NOVELLI; CINTRÓN-MOLERO, 1994).

2.1.2 Vegetação

A vegetação dos manguezais é representada por somente 28 gêneros e 73 espécies, aproximadamente, as quais desenvolveram ao longo da evolução adaptações únicas para sobreviver na condições severas que caracterizam a interface oceano/continente (DUKE; ALLEN, 2006). Apesar de os manguezais constituírem apenas 1% da área de florestas tropicais, eles são produtivos e possuem uma rica biodiversidade (ALONGI, 2002).

A flora dos manguezais no Brasil geralmente consiste em três gêneros típicos de mangues, algumas gramíneas e várias epífitas (samambaias, orquídeas e bromélias). Há também a vegetação de transição entre o manguezal e outros ecossistemas (como a restinga). Os mangues

ocorrentes no Brasil incluem as espécies: *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn f. (mangue-branco), *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechman (mangue-preto, siriúba ou mangue-siriúba) e *Rhizophora mangle* Linnaeus (mangue-vermelho). Também são encontradas as espécies de transição para o ambiente terrestre tais como *Hibiscus* spp. (guaxima-do-mangue), *Acrostichum aureum* Linnaeus (avencão) e *Conocarpus erectus* Linnaeus (mangue-de-botão). As gramíneas mais comuns são as *Spartina* spp. (capim paraturá), comuns em margens com o mar e clareiras (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1990).

As principais espécies de mangue são plantas lenhosas halófitas facultativas. Plantas halófitas são adaptadas a entrada de sal pelas raízes, porém necessitam eliminar ou diluir o excesso de sal. As glândulas de sal, localizadas nas folhas de *Avicennia* e *Laguncularia* permitem que essas plantas eliminem o excesso do sal, evitando que este circule juntamente com a seiva elaborada (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995; TOMLINSON, 1986; DUKE, 1992). Outra adaptação dos mangues é o sistema radicular. Em *Rhizophora mangle*, as raízes-escora auxiliam a sustentação da planta no sedimento inconsolidado (TOMLINSON, 1986; DUKE, 2002). Em *Avicennia* e *Laguncularia*, podem-se observar os pneumatóforos, que são estruturas de ramificações com geotropismo negativo que surgem das raízes axiais, desempenhando importante função no processo de respiração dos mangues (DUKE, 1992). As adaptações morfofisiológicas dos mangues estão representadas na FIGURA 2.

Figura 2 – Adaptações morfofisiológicas dos mangues. A: Glândulas de sal. B: Raízes-escora. C: Pneumatóforos. Fonte: Google imagens.



A - Disponível em: <<http://www.natgeocreative.com/photography/1037713>> Acesso em: 21 jan. 2014.

B - Disponível em: <http://www.vivaterra.org.br/arvores_nativas_2.htm> Acesso em: 21 jan. 2014.

C - Disponível em: <<http://caminhosdabio.wordpress.com/2011/11/01/mangrove-manguezal-2/>> Acesso em: 21 jan. 2014.

A variação espacial na ocorrência e abundância das espécies é frequentemente observada em muitos gradientes ambientais em vários tipos de ecossistemas (MENDELSSOHN; MCKEE, 2000). A zonação das comunidades vegetais em habitats intertidais é particularmente notável e muitas vezes resulta em bandas de só uma espécie de vegetação que ocorre paralelamente à costa. Embora os padrões de zonação sejam geralmente retratados de uma maneira que sugere uma sequência rígida procedente do litoral para o continente, muitos se assemelham a um mosaico, com os padrões de vegetação que ocorrem repetidamente, onde os sedimentos são interrompidos por cursos de água ou outras variações de topografia.

Os manguezais apresentam zonação em diferentes regiões geográficas (MENDELSSOHN; MCKEE, 2000). A grande variação na composição florística das comunidades de mangues significa que os padrões de distribuição de espécies em toda a zona intertidal também variam substancialmente entre as regiões geográficas. Por exemplo, a zonação na Flórida e no Caribe mostra frequentemente a *R. mangle* (mangue vermelho) ocupando a zona em direção ao mar, seguido por *A. germinans* (mangue preto), e *L. racemosa* (mangue branco) na posição mais em direção à terra. Este padrão pode ser contrastado com um perfil para o nordeste da Austrália (Queensland), que não só é mais complexo devido a um maior número de espécies, mas também pela posição relativa das espécies congêneres que é inversa a da Flórida (por exemplo, *Avicennia* spp. na posição em direção ao mar e *Rhizophora* spp. na posição em direção à terra) (BALL, 1980; SMITH; DUKE, 1987).

Padrões de zoneamento em florestas de mangue também podem variar em uma escala local. A ocorrência de espécies pode diferir dentro de um mesmo estuário, aparentemente em resposta a diferenças na entrada de água doce. Por exemplo, espécies encontradas em direção ao mar no final do estuário podem estar ausentes nas cabeceiras. Embora a zonação tipicamente refira-se a padrões criados por segregação de diferentes espécies, as diferenças de altura e a produtividade vegetal através de gradientes ambientais podem também resultar em padrões

facilmente diferenciáveis. As zonas podem ser constituídas por diferentes formas de arquitetura que representam variações de altura e vigor (DUKE; BALL; ELLISON, 1998).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar os padrões de zonação em espécies de mangues:

- 1) a zonação refletiria a morfologia do terreno e a sucessão da vegetação;
- 2) processos geomorfológicos causariam a zonação na vegetação;
- 3) dispersão diferencial de propágulos por meio de um gradiente seria resultado de uma triagem física das espécies pela ação das marés;
- 4) a predação diferencial de propágulos em toda a zona intertidal eliminaria algumas espécies a partir de certas zonas;
- 5) limites de especialização fisiológica de distribuição das espécies a certas porções do gradiente, onde as condições físico-químicas são diferentes; e
- 6) competição interespecífica.

Os manguezais são provavelmente melhor descritos como ecossistemas que migram em direção ao mar ou ao continente dependendo da subida ou descida do nível do mar, das taxas de sedimentação, da topografia e da energia das ondas (LUGO, 1980). A geomorfologia costeira é importante em determinar as condições físicas e químicas para o desenvolvimento dos manguezais e pode explicar as diferenças regionais nos padrões de zonação. Entretanto, somente a geomorfologia como uma explicação para os padrões de zonação não é satisfatória, pois não explica como ocorre a segregação das espécies. As últimas 4 hipóteses oferecem explicações claras para a zonação nos manguezais. A importância relativa de cada um desses processos é que se mantém incerta, mas provavelmente varia entre as regiões (BALL, 1980).

Além dos padrões de zonação horizontal, os manguezais exibem uma estratificação vertical. Existem 3 principais extratos: supratidal, intertidal e subtidal, os quais podem ser facilmente observados com a variação das marés. Uma assembleia única de organismos associados aos mangues caracteriza cada um desses extratos. O extrato supratidal inclui a porção arbórea da floresta e é ocupada por pássaros, répteis, caranguejos, caracóis, insetos e aranhas. A porção intertidal se estende desde aonde a maré mais alta atinge até aonde chega a maré mais baixa, inclui os sistemas de raízes aéreas e o sedimento lamoso. Os organismos habitantes desta zona incluem cracas, isópodes, caranguejos, ostras, anfípodes, caracóis e algas, por exemplo, os

quais estão adaptados às variações periódicas da maré. O extrato subtidal é a área que está sempre submersa e os organismos habitantes desta área, como algas, esponjas, tunicados, anêmonas, octocorais, camarões, poliquetas, ofiúros e medusas estão adaptados a submersão constante e as raízes de mangue que ficam submersas servem como substrato para esses organismos (HUTCHINGS; SAENGER, 1987).

A vegetação do manguezal, seus nutrientes e os micro-organismos tem um relacionamento íntimo que atua como um mecanismo para reciclar e conservar nutrientes no ecossistema. Uma comunidade microbiana diversa transforma continuamente a vegetação morta em fontes de nutrientes tais como nitrogênio, fósforo e outros que são, subsequentemente, assimilados pelas plantas. Em troca, os exsudatos das raízes servem como uma fonte de nutrientes para os micro-organismos (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). Portanto, a importância de se estudar os micro-organismos reside na elucidação de vários processos que ocorrem em ambientes naturais e na conservação desses ambientes. As florestas de manguezal criam ambientes pantanosos abrigados que facilitam a deposição de sedimentos de granulometria fina geralmente enriquecidos com nutrientes, metais e minerais. Por esta razão, os ambientes de manguezal são locais ideais para se estudar inúmeros processos biogeoquímicos, hidrogeoquímicos e hidrológicos (KATHIRESAN, 2012).

2.1.3 Ciclagem de nutrientes e micro-organismos em sedimentos de manguezais

Apesar de serem ricos em matéria orgânica, os manguezais são deficientes em nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo (HOLGUIN; GUZMAN; BASHAN, 1992; ALONGI; CHRISTOFFERSEN; TIRENDI, 1993). Apesar disso, eles são produtivos. Este paradoxo pode ser explicado por uma ciclagem de nutrientes muito eficiente no qual nutrientes essenciais, que são escassos, são retidos e novos nutrientes são regenerados por meio da decomposição das folhas do mangue. A atividade microbiana é responsável por grande parte da transformação de nutrientes em ecossistemas de manguezal (ALONGI; CHRISTOFFERSEN; TIRENDI, 1993; HOLGUIN *et al.*, 1999). Em manguezais tropicais, bactérias e fungos constituem 91% da biomassa microbiana total, enquanto algas e protozoários representam somente 7 e 2%, respectivamente (ALONGI, 2002). As bactérias são responsáveis por grande parte do ciclagem

de carbono em sedimentos de manguezais tropicais. Elas processam grande parte do fluxo de energia e nutrientes e atuam como sequestradoras de carbono. De acordo com Alongi *et al.* (1989), uma comunidade bacteriana extremamente ativa e produtiva vive nos sedimentos de manguezais.

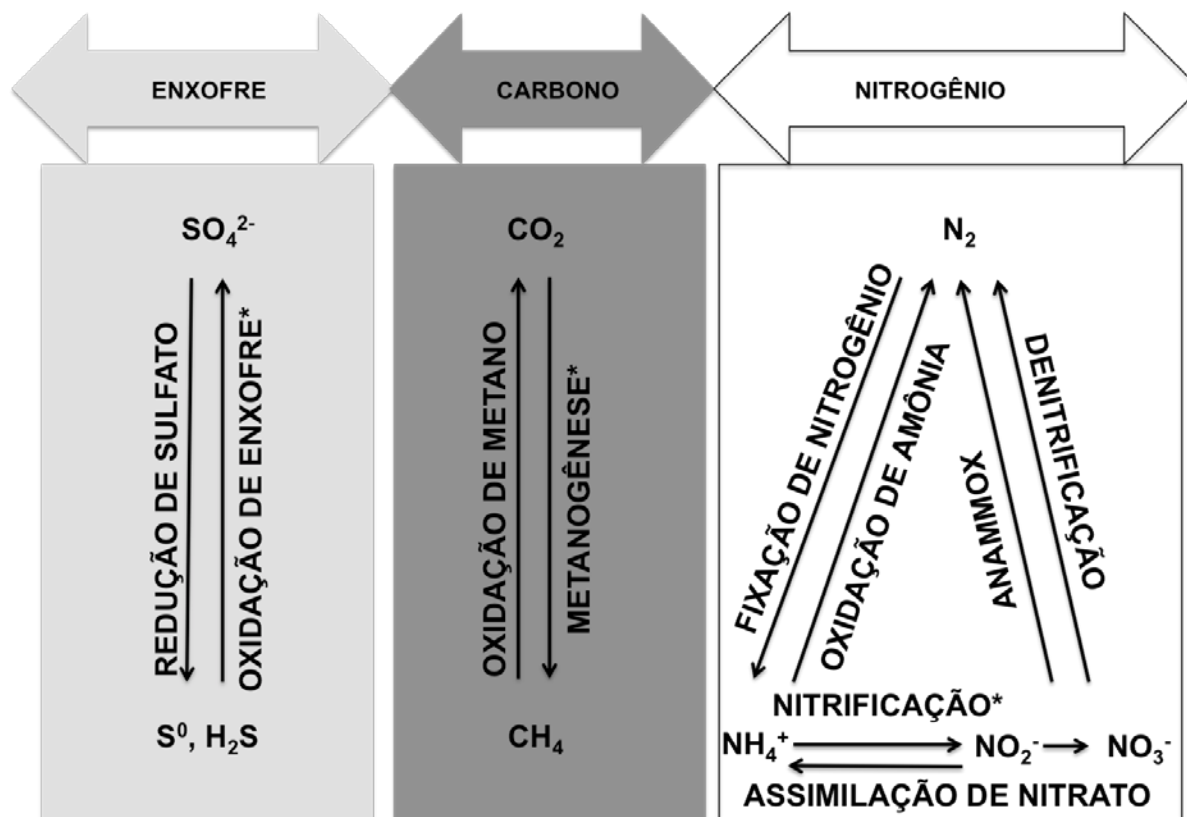
Uma grande competição entre bactérias e plantas pelo nitrogênio disponível pode existir nos ambientes de manguezal. O nitrato presente em sedimentos, derivado da degradação de componentes orgânicos nitrogenados, é provavelmente convertido em íons amônia por bactérias, sendo posteriormente assimilados por plantas e bactérias. Este processo conserva o nitrogênio dentro do ecossistema (RIVERA-MONROY *et al.*, 1995). Outros processos que podem conservar o nitrogênio no sistema são a redução de nitrato a amônia (TIEDJE, 1988) e a possível oxidação anaeróbica de amônia (JETTEN *et al.*, 1999).

Em ecossistemas de manguezais, as altas taxas de fixação de N₂ tem sido associadas com folhas mortas e em decomposição, pneumatóforos, rizosfera e biofilmes de cianobactérias que cobrem a superfície do sedimento, bem como os próprios sedimentos (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). Por causa do alto gasto de energia na fixação do N₂, é esperado que fossem detectadas altas taxas deste processo em ambientes costeiros que acumulam matéria orgânica, tais como as marismas e os manguezais. Em manguezais, foi encontrada uma correlação positiva entre a fixação de nitrogênio e a disponibilidade de matéria orgânica (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

A fixação de nitrogênio é uma das principais atividades bacterianas em manguezais. As principais bactérias identificadas como fixadoras de nitrogênio são membros do gêneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium* e *Klebsiella*, as quais já foram isoladas em manguezais. A capacidade dessas bactérias em fixar nitrogênio foi similar as de bactérias diazotróficas de ambientes terrestres tais como *Azospirillum* spp. (HOLGUIN; BASHAN, 1996).

Outra importante transformação do nitrogênio é a oxidação de amônia, conhecida também como nitrificação (FIGURA 3). Esta transformação é o primeiro e limitante passo da transformação da amônia em nitrato, via nitrito, sendo essencial para a ciclagem de nitrogênio no ambiente. Recentemente o conhecimento do ciclo do nitrogênio teve de ser revisado pela descoberta da oxidação de amônia por arqueias (anammox). Até essa descoberta acreditava-se que a oxidação de amônia era feita somente por bactérias autotróficas (KÖNNEKE *et al.*, 2005).

Figura 3 – Representação esquemática das reações mediadas por bactérias e arqueias dos ciclos do enxofre, carbono e nitrogênio que ocorrem nos manguezais. Os asteriscos indicam os processos nos quais as arqueias são predominantes nos ciclos globais (adaptado de JARRELL *et al.*, 2011).



O domínio Archaea, o qual foi primeiramente descrito como uma das três domínios da vida por Woese *et al.* em 1990, foi durante muitos anos associado a ambientes extremos, porém estudos recentes apontam que as arqueias compreendem uma fração significativa da microbiota total, tipicamente 10% dos filotipos de RNAr em vários ambientes analisados, indicando que este domínio é cosmopolita e provavelmente tem um grande impacto no ciclos globais de nutrientes (ROBERTSON *et al.*, 2005). Entretanto o domínio arqueia não foi estudado na mesma extensão que os outros dois domínios, Bacteria e Eukarya, em vários ambientes, incluindo os manguezais.

As arqueias estão divididas em 2 principais filis: Euryarchaeota e Crenarchaeota. O primeiro é considerado o mais diverso fisiologicamente e inclui organismos metanogênicos,

halófilos e termófilos. O filo Crenarchaeota é menos diverso e inclui organismos termofílicos extremos que metabolizam o enxofre liberado de fontes hidrotermais (VETRIANI *et al.*, 1999). Mais recentemente vários grupos de Crenarchaeota mesofílicas não cultivadas foram afiliadas com um novo e extremamente divergente clado distantemente relacionado com hipertermófilos e um novo filo chamado Thaumarchaeota foi proposto (AUGUET *et al.*, 2010).

As arqueias oxidadoras de amônia (AOA) são membros deste novo filo e são agora reconhecidas como sendo ubíquas. Em muitos ambientes são mais abundantes que as bactérias oxidadoras de amônia (AOB) e estão entre os micro-organismos mais abundantes da Terra (SCHLEPER; NICOL, 2010). Entretanto, arqueias e bactérias oxidadoras de amônia atuam diferencialmente sob diferentes concentrações de nitrogênio no ambiente, de tal forma que as AOB são favorecidas pela alta disponibilidade de nutrientes no solo, enquanto as AOA preferem ambientes oligotróficos, atuando, assim, em diferentes nichos.

De fato, a comunidade de arqueia parece ser dominante em solos com baixo teor de nitrogênio e baixa taxa de nitrificação (SCHLEPER, 2010; TOURNA *et al.*, 2008). A dominância de comunidades de arqueia sob condições limitadas de nutrientes pode ser atribuída a adaptação desse grupo à condições estressantes, o que é um fator que diferencia a ecologia de bactérias e arqueias (VALENTINE, 2007). As arqueias também estão envolvidas em outras atividades dentro do ciclo do nitrogênio. A descoberta da fixação de nitrogênio por arqueias metanogênicas estendeu essa importante atividade para o domínio Archaea (JARRELL *et al.*, 2011).

Há algum tempo já se sabia do papel essencial das bactérias metanogênicas na decomposição de materiais orgânicos complexos em uma variedade de habitats anaeróbicos. Já as arqueias metanogênicas possuem a peculiar habilidade de converter um número limitado de compostos simples de carbono em metano. Vários fatores podem influenciar a metanogênese, tais como a salinidade, a temperatura, o pH, a presença do substrato e interações microbianas com outros grupos anaeróbicos, como as bactérias redutoras de Fe (III), as bactérias acetogênicas e as redutoras de sulfato (FERRY, 1993). Nos ambientes costeiros, as altas concentrações de sulfato podem favorecer a redução deste composto em detrimento da metanogênese, por ser uma reação energeticamente mais favorável (LYIMO; POL; DEN-CAMP, 2002). Entretanto os dois processos podem coexistir como uma resposta a alta salinidade dos manguezais por serem compostos osmorreguladores (FERRY, 1993).

Em ambientes com alta concentração de matéria orgânica, a disponibilidade de substrato é suficiente para manter ambas as atividades. O metano produzido em sedimentos anaeróbicos pode ser oxidado na zona aeróbica por bactérias metanotróficas ou até mesmo em anaerobiose por arqueias metanogênicas (MEULEPAS *et al.*, 2010). Portanto, a relação entre a produção e o consumo de metano permite a intensa produção sem gerar grandes concentrações deste composto ou aumento da emissão deste gás para a atmosfera (GIANI *et al.*, 1996).

As altas taxas de redução de sulfato em sedimentos de manguezais coincidem com a presença dos sistemas de raízes subterrâneas dos mangues (KRISTENSEN *et al.*, 2008) e foi calculada como sendo equivalente a 30 a 80% da produtividade primária bruta dos manguezais (ALONGI, 1994). Sedimentos de manguezais são predominantemente anaeróbicos com uma fina camada superficial aeróbica. A degradação da matéria orgânica na zona aeróbica ocorre principalmente pela respiração aeróbica, enquanto que na camada anaeróbica ocorre principalmente pela redução de sulfato (NEDWELL *et al.*, 1994; SHERMAN; FAHEY; HOWARTH, 1998). A redução de sulfato é responsável por quase 100% da emissão total de CO₂ no sedimento (KRISTENSEN *et al.*, 2008).

As taxas de redução de sulfato dependem da disponibilidade de matéria orgânica e dos processos físicos que afetam a mistura e a inundação dos sedimentos superficiais. A inundação, por sua vez, é afetada pela frequência e níveis da inundação e pelas características geomorfológicas (profundidade e largura) das bacias de drenagem (SHERMAN; FAHEY; HOWARTH, 1998).

O estabelecimento de populações de bactérias redutoras de sulfato pode ser limitado pela disponibilidade de sulfato. Em manguezais com acesso à água doce a concentração de sulfato pode ser reduzida abaixo de um limite em que é induzida a proliferação de grupos bacterianos anaeróbicos (SHERMAN; FAHEY; HOWARTH, 1998).

Em sedimentos de manguezais, a disponibilidade de ferro e fósforo pode depender da atividade de bactérias redutoras de sulfato. Sob condições anaeróbicas, o fosfato dissolvido reage com oxi-hidróxido de ferro criando o complexo insolúvel FeOOH-PO₄. Quando o sulfato é reduzido por bactérias redutoras de sulfato, compostos de enxofre solúveis tais como H₂S e HS são produzidos. Esses compostos de enxofre solúveis reagem com ferro, reduzindo Fe(III) a Fe(II) e produzindo pirita (FeS₂). A pirita é o principal produto da redução de sulfato em

marismas (SHERMAN; FAHEY; HOWARTH, 1998). A redução de Fe(III) a Fe(II) libera fosfato solúvel. A oxidação intensa dos sedimentos ocasionada pelas marés pode reverter o processo e reoxidar a pirita a óxidos de Fe(III) (SHERMAN; FAHEY; HOWARTH, 1998).

As bactérias redutoras de sulfato, como os principais decompositores de matéria orgânica em sedimentos anaeróbicos, desempenham um papel fundamental na mineralização de enxofre orgânico e na formação de fósforo e ferro solúveis que são usados pelos organismos em ecossistemas de manguezal. As bactérias redutoras de sulfatos também contribuem com a fixação de nitrogênio (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

Geralmente fosfatos precipitam por conta da abundância de cátions na água intersticial fazendo com que o fósforo fique indisponível para as plantas. As bactérias solubilizadoras de fosfato, como fornecedoras em potencial de formas solúveis de fósforo, seriam de grande vantagem para a vegetação do manguezal. As condições predominantemente anóxicas dos sedimentos abaixo da zona aeróbica favoreceriam a dissolução do fosfato não solúvel pela produção de sulfeto. Entretanto, dependendo do grau de aeração da rizosfera, as bactérias podem ter uma função valiosa em solubilizar o fosfato próximo às raízes, onde os sedimentos não são completamente anóxicos (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

Historicamente, acreditava-se que as bactérias eram os organismos dominantes na oxidação de enxofre e ferro, porém estudos recentes indicam que arqueias termoacidófilas pertencentes à família Thermoplasmatales (a qual inclui os gêneros *Ferroplasma* e *Thermoplasma*) (BINI, 2010) também desempenham papéis na oxidação do enxofre, especialmente em ambientes com o pH ácido. Como em sedimentos de manguezais o pH decresce com a profundidade, essas arqueias têm papel fundamental no ciclo do enxofre em camadas mais profundas dos sedimentos.

O imenso valor ecológico dos manguezais já foi reconhecido e informações acerca desses ambientes foram recentemente atualizadas por Spalding *et al.* em 2010. Apesar da atestada importância desses ambientes, o conhecimento das relações entre os organismos e os ciclos biogeoquímicos que nele ocorrem ainda está incompleto devido a escassez de informações acerca da ecologia microbiana desses ambientes (GOMES *et al.*, 2008).

2.1.4 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, estima-se que menos de 1% das células observadas por contagem direta é recuperado por métodos de cultivo tradicionais, um fenômeno que foi denominado de “grande anomalia da contagem em placas”. Uma das razões para explicar esse fenômeno pode ser atribuída à interdependência de diferentes organismos uns 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).

Portanto, a grande maioria dos micro-organismos de ambientes naturais estava inacessível até o advento das análises moleculares, também conhecidas como independentes de cultivo, as quais utilizam a heterogeneidade de sequências de genes para ter acesso à diversidade microbiana em um determinado ambiente. Os genes primeiramente utilizados nesses estudos correspondiam aos que codificam para os RNAs ribossomais (RNAr), os quais estão entre as macromoléculas mais conservadas em todos os sistemas vivos. Grandes porções de genes do RNAr 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 RNAr são índices de mudanças evolutivas (PACE; OLSEN; WOESE, 1986).

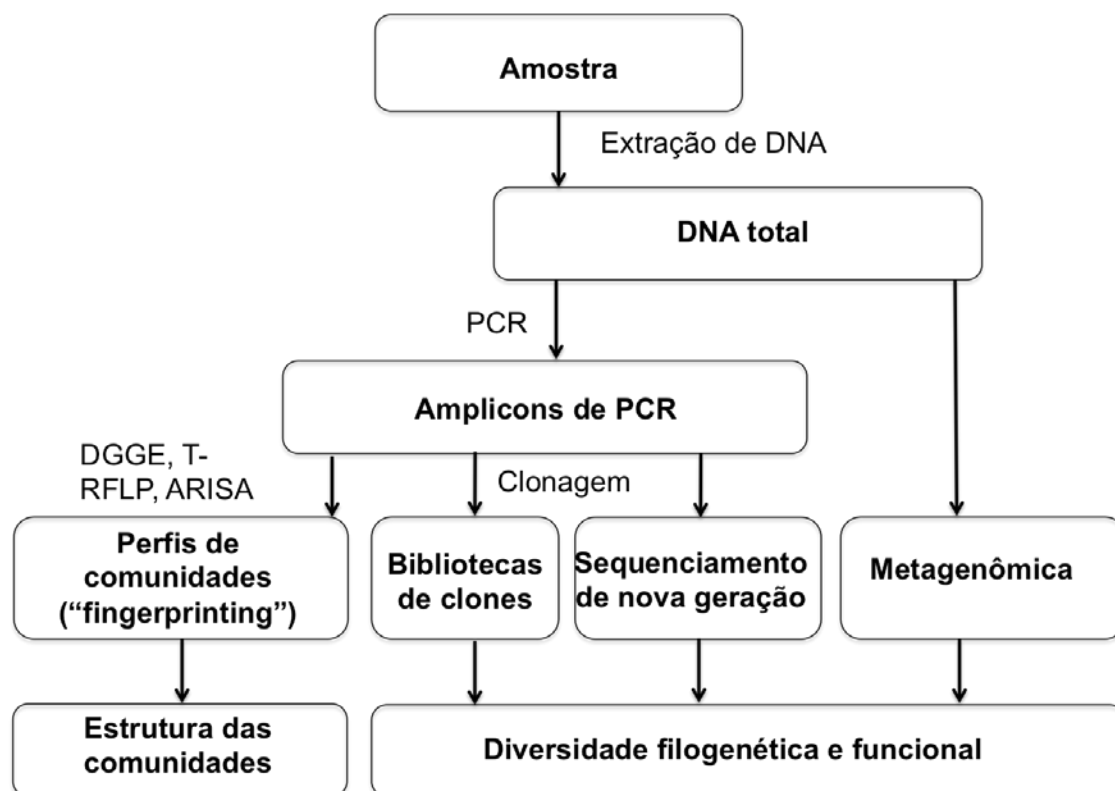
Existem 3 RNAr em procariotos, o 5S (~120 nucleotídeos), o 16S (~1600 nucleotídeos) e o 23S (~3000 nucleotídeos). Os RNAr 5S e 16S têm sido os mais utilizados para a maioria dos estudos em ecologia microbiana, principalmente por razões técnicas e históricas. O RNAr 5S, por ser relativamente pequeno, foi largamente utilizado no final dos anos 60 para análise de sequências. Entretanto, a escassez de regiões de variabilidade no RNAr 5S limitou a sua utilização. O RNAr 16S tem tamanho apropriado para análises filogenéticas, mas era até então considerado 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 RNAr 16S é usado para determinar as relações filogenéticas (ATLAS; BARTHA, 1998).

Realmente, Woese *et al.* (1990), ao estudarem o RNAr 16S, argumentaram que este é um excelente cronômetro molecular pelo fato de que é encontrado em todos os organismos procariotos, possui longas regiões 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.

Nos anos 80, com o advento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) na qual milhões de cópias do gene-alvo são geradas em apenas algumas horas, houve o desenvolvimento de técnicas que se utilizam desses chamados produtos de PCR para análises de comunidades microbianas. A PCR pode ser baseada em DNA ou RNA mas, para este último, deve-se primeiramente fazer uma transcrição reversa, resultando em um DNA complementar (cDNA). A PCR baseia-se na extensão enzimática cíclica de uma região particular do gene (usando ciclos de desnaturação e anelamento), com dois iniciadores que se ligam nas extremidades opostas do molde. Este resulta na produção de várias cópias da região flanqueada pelos dois iniciadores (ERLICH; ARNHEIM, 1992).

Um passo importante para o estudo da microbiota de diversos ambientes por meio de DNA (e/ou RNA) foi o desenvolvimento da amplificação por PCR de genes-alvo. Tais genes-alvo incluem o gene ribossômico do RNA 16S (RNAr), o gene *rpoB* (que codifica para a subunidade β da RNA polimerase de bactérias) ou genes marcadores funcionais como *amoA* (que codificam a amônia mono-oxigenase, uma enzima chave na oxidação da amônia) ou *nifH* (uma enzima chave na fixação de nitrogênio). Usando PCR seguido de clonagem e sequenciamento ou abordagens de perfis de comunidade (*fingerprinting*), informações sobre as sequências existentes do gene escolhido podem, assim, ser obtidas a partir de ácidos nucleicos (VAN ELSAS; BOERSMA, 2011). A figura 4 apresenta de forma esquemática as etapas gerais dos estudos independentes de cultivo.

Figura 4 – Representação esquemática das etapas dos métodos moleculares (independentes de cultivo). Adaptado de Lynch *et al.* (2004).



As técnicas dependentes de PCR mais comumente utilizadas em estudos de diversidade microbiana são a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE; MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993), a análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA; HEYNDRIKX *et al.*, 1996), 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 ribossômico (RISA; RANJARD *et al.*, 2000), o RISA automatizado (ARISA; CARDINALE *et al.*, 2004), e a análise de sequências de bibliotecas de clones do gene RNAr 16S (OLSEN *et al.*, 1986). Todas essas abordagens têm vantagens e desvantagens que precisam ser consideradas na escolha do método a ser utilizado (TABELA 1).

Tabela 1 – Visão geral dos principais métodos independentes de cultivo usados em ecologia microbiana. Adaptado de van Elsas; Boersma (2011).

Técnica	Resultado	Vantagens	Desvantagens
SSCP ARDRA DGGE T-RFLP RISA ARISA	Fornecem perfis da estrutura das comunidades microbianas, possuem diferentes níveis de sensibilidade	Fácil comparação entre amostras, útil para monitoramento de mudanças nas comunidades microbianas ao longo do tempo	Não identifica os táxons presentes nas amostras, baixa reprodutibilidade, estimativas de diversidade inacuradas e não capturam a presença de táxons raros
qPCR (PCR quantitativo)	Quantificação de representantes de organismos ou genes	Técnica de rotina, alta sensibilidade, permite quantificação	Vieses da técnica de PCR, inibição, produção de artefatos
Biblioteca de clones	Identificação das sequências dominantes na comunidade	Permite estimativas de diversidade	Preparação laboriosa, baixo número de sequências
Sequenciamento em larga escala (pirosequenciamento, sequenciamento de produtos de PCR e metagenômica)	Gera grande quantidade de informação baseadas em sequências	Análise de alto rendimento, grande potencial para estudos comparativos	Formação de artefatos e erros de sequenciamento que podem levar a interpretações errôneas

Após a PCR, seja do gene RNAr 16S ou de um gene funcional de escolha, a análise das sequências-alvo amplificadas é necessária para produzir os dados sobre as comunidades microbianas. Estas análises posteriores podem prosseguir por meio de, por exemplo, T-RFLP que produz perfis de comunidade relativamente simples que podem ser utilizados para fins comparativos (OSBORN; MOORE; TIMMIS, 2000).

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 análise por DGGE consiste na eletroforese de fragmentos do DNAr 16S amplificados por PCR, onde 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 gradiente crescente de agentes desnaturantes (ureia 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 (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993).

Produtos de PCR também podem ser usados de um modo quantitativo utilizando uma abordagem “em tempo real”. O princípio do presente método encontra-se na geração de um sinal fluorescente e detectável pela atividade de exonuclease da polimerase. O sinal é produzido em cada ciclo da reação de PCR. Instrumentos sensíveis foram desenvolvidos para permitir a detecção em tempo real do sinal produzido. Quando se passa de um determinado nível de limiar, o sinal é transformado em números de genes alvo previstos sobre a base de uma linha de calibração pré-estabelecida com o DNA alvo padrão. O PCR quantitativo (qPCR) é atualmente amplamente aplicado ao DNA extraído de diversos ambientes, permitindo a quantificação do número de genes-alvo, tais como genes 16S RNAr (para quantificar as bactérias, por exemplo) ou de genes funcionais, como *amoA* ou *nifH* (SMITH; OSBORN, 2009).

Alternativamente, a clonagem seguida por sequenciamento de clones selecionados pode ser utilizada fornecendo informações sobre a diversidade e a natureza das sequências-alvo. Em análises de bibliotecas de clones, os amplicons de PCR gerados são ligados em um vetor adequado. Subsequentemente, as construções resultantes são introduzidas em uma célula

hospedeira por transformação. Depois do crescimento das colônias isoladas que receberam vetores com inserto, os amplicons clonados podem ser extraídos, sequenciados e as sequências analisadas por comparação com sequências depositadas em bases de dados disponíveis. No que diz respeito à compreensão da diversidade da comunidade esta é maior do que nas das técnicas de *fingerprinting*, isto é devido ao fato de que as sequências são analisadas separadamente e são bem melhor detectáveis. Porém as curvas de rarefação (o número total de sequências pelo número de espécies diferentes obtidas) mostram que, para a maioria dos ambientes, a fim de alcançar uma cobertura satisfatória da diversidade microbiana, muitas vezes é necessário sequenciar um número exageradamente elevado de sequências (mais de 1500) (JONES *et al.*, 2009).

A análise das bibliotecas de clones é um método bastante trabalhoso, que tem sido substituído pelo sequenciamento de nova geração, permitindo uma análise em profundidade dos micro-organismos ou genes funcionais presentes nos ambientes. O sequenciamento de nova geração facilita a geração direta de dados de diversidade de sequências de DNA, evitando, assim, o passo da clonagem. Bibliotecas de clones têm alta resolução, mas não são capazes de detectar as espécies menos abundantes (raras), não permitindo uma visão geral da diversidade por amostra ou a diferença entre as amostras (VAN ELSAS; BOERSMA, 2011).

As novas tecnologias de sequenciamento, denominadas “nova geração”, começaram a ser comercializadas em 2005 e estão evoluindo rapidamente. Todas essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida. Dentre as novas plataformas de sequenciamento, duas são as mais utilizadas em todo o mundo: a plataforma 454 FLX da Roche (pirosequenciamento) e a Solexa da Illumina. Outros dois sistemas de sequenciamento utilizados são a plataforma da *Applied Biosystems*, denominada *SOLiD System*, e o *HeliscopeTrue Single Molecule Sequencing* (tSMS), da *Helicos*, *Ion Torrent* (Life Technologies) e SMRT (Pacific Biosystems). Essas novas plataformas possuem como característica comum a capacidade de gerar informação muitas vezes maior que o sequenciamento de primeira geração de Sanger (SANGER; COULSON, 1975), com uma grande economia de tempo e custo por base para o sequenciamento (Tabela 2). Essa maior eficiência advém do uso da clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento, não precisando mais do intensivo trabalho laboratorial de produção de clones, da montagem das placas de sequenciamento e da separação dos fragmentos em géis.

Tabela 2 - Comparativo entre o sequenciamento de Sanger e as diversas plataformas de sequenciamento de nova geração.

Ano de Introdução	Método ou Plataforma de sequenciamento	Tamanho máximo de leituras	Rendimento por corrida
1977	Sanger	1000 pb	100 Kpb
2005	454 (Life Science/Roche Diagnostics)	500 pb	500 Mpb
2005	ABI SOLID (Life Technologies)	50 pb	30 Gpb
2007	Illumina Genome Analyser (Solexa)	150 pb	600 Gpb
2010	Helicos (Helicos Biosciences)	55 pb	35 Gpb
2010	Ion Torrent (Life Technologies)	200 pb	1 Gpb
2010	SMRT (Pacific Biosystems)	2000 pb	100 Mpb

O sequenciamento na plataforma Illumina, particularmente, assim como o sequenciamento pelo método de Sanger, é realizado por síntese usando DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. A inovação consiste na clonagem *in vitro* dos fragmentos em uma plataforma sólida de vidro, processo também conhecido como PCR de fase sólida (FEDURCO *et al.*, 2006; TURCATTI *et al.*, 2008). A superfície de clonagem (*flow cells*) na plataforma HiSeq é dividida em oito linhas que podem ser utilizadas para o sequenciamento de até oito bibliotecas, já o Miseq, uma versão mais compacta e acessível, só possui uma linha. Em cada linha, adaptadores são fixados à superfície pela extremidade 5', deixando a extremidade 3' livre para servir na iniciação da reação de sequenciamento dos fragmentos imobilizados no suporte por hibridização.

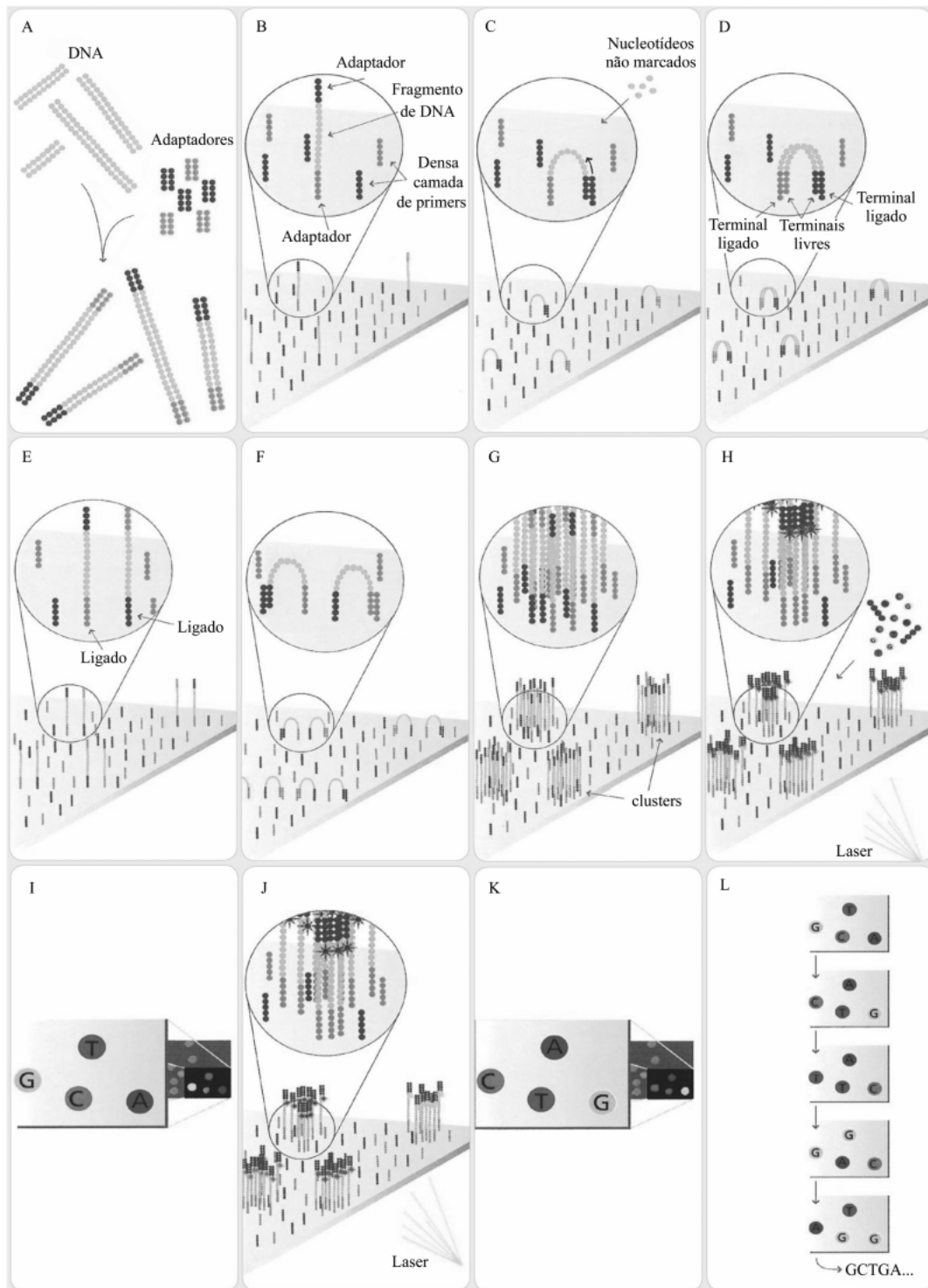
Os fragmentos de DNA da amostra são também ligados aos adaptadores em ambas as extremidades, o que permite sua fixação ao suporte de sequenciamento por hibridização a um dos adaptadores fixados. No primeiro ciclo de amplificação, nucleotídeos não marcados são fornecidos para que haja a síntese da segunda fita do fragmento imobilizado no suporte. A alta densidade de adaptadores no suporte facilita a hibridização do adaptador livre dos fragmentos

imobilizados a sua sequência complementar fixa perto do clone inicial durante o ciclo de anelamento.

Após o ciclo de anelamento, o fragmento forma uma estrutura em “ponte” na superfície de sequenciamento e a extensão ocorre, formando a fita complementar também em “ponte”. No ciclo de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas. Esses ciclos são repetidos 35 vezes e assim as cerca de mil cópias geradas de cada fragmento nessa PCR de fase sólida permanecem próximas umas das outras, formando um *cluster* de sequenciamento. Etapas de desnaturação são necessárias para a separação dos duplex formados e, nos próximos ciclos de amplificação, nucleotídeos terminadores marcados são fornecidos para as reações de sequenciamento que ocorrem dentro de cada *cluster*.

A alta densidade dos *clusters* de sequenciamento possibilita que o sinal de fluorescência gerado com a incorporação de cada um dos nucleotídeos terminadores tenha uma intensidade suficiente para garantir sua detecção exata. Até 50 milhões de *clusters* podem ser produzidos por linha, correspondendo a uma representação satisfatória da biblioteca. Após a incorporação de cada nucleotídeo no fragmento em síntese, a leitura do sinal de fluorescência é realizada. Em seguida, ocorre uma etapa de lavagem para remoção dos reagentes excedentes e remoção do terminal 3' bloqueado e do fluoróforo do nucleotídeo incorporado no ciclo anterior para que a reação de sequenciamento prossiga. A leitura das bases é feita pela análise sequencial das imagens capturadas em cada ciclo de sequenciamento. Em geral, leituras de 25-35 bases são obtidas de cada *cluster* (SHENDURE; JI, 2008). As etapas do sequenciamento estão representadas na figura 5.

Figura 5 – Representação esquemática do princípio tecnológico da plataforma Illumina. O DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A e B em ambas as extremidades (A). As moléculas de DNA fita simples são aderidas por afinidade ao suporte sólido onde estão também aderidos em alta densidade oligonucleotídeos complementares aos adaptadores A e B (B). Durante a etapa de anelamento (C), no primeiro ciclo de amplificação da PCR em fase sólida, o adaptador da extremidade livre da molécula aderida ao suporte encontra seu oligonucleotídeo complementar no suporte, formando uma estrutura em ponte. Uma vez fornecidos os reagentes necessários, a PCR é iniciada utilizando a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como iniciador (C e D). Na etapa de desnaturação (E), a “ponte” é desfeita mediante elevação de temperatura. Repete-se a etapa de anelamento (F), formando novas estruturas em ponte e iniciando um novo ciclo de amplificação. Após uma série desses ciclos, serão obtidos *clusters* de moléculas idênticas ligadas ao suporte (G). Com a incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser (H), é gerado o sinal, o qual é captado por dispositivo de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos componentes da cadeia (I). O processo de incorporação de nucleotídeo marcado, excitação e leitura é repetido para cada nucleotídeo componente da sequência (J, K). A leitura é feita de forma sequencial, o que permite a montagem da sequência completa de cada *cluster* (L). Fonte: CARVALHO; SILVA, 2010



Os fragmentos obtidos pelas tecnologias de sequenciamento de nova geração são mais curtos do que os gerados pelo método de Sanger, o que torna a montagem das sequências uma tarefa mais desafiadora. Além dos menores fragmentos essas tecnologias geram um maior volume de dados (TABELA 2), sendo necessário aumentar o poder de processamento dos computadores. Atualmente há um esforço para se desenvolver programas de bioinformática para se aumentar a acurácia na montagem das sequências e análise dos dados (HERNANDEZ *et al.*, 2008).

Atualmente, com o avanço das técnicas de sequenciamento de nova geração e as ferramentas de bioinformática está havendo uma expansão nos estudos de ecologia microbiana de tal maneira que as barreiras metodológicas estão rapidamente sendo substituídas por barreiras conceituais para o progresso da ecologia microbiana, ou seja, o rápido acúmulo de dados gerados por essas técnicas mais robustas não está sendo acompanhado pelo acúmulo de conhecimento ecológico, pois ainda não há o completo entendimento da complexidade e diversidade de microorganismos, sendo um desafio a geração de teorias (RAMETTE; TIEDJE; BOETIUS, 2009).

2.1.5 Estudos de ecologia microbiana em sedimentos de manguezais do Brasil – Domínios Archaea e Bacteria

Apesar da grande área de manguezais do Brasil e da importância desses ecossistemas, o conhecimento sobre ecologia microbiana nesses ambientes é escasso. A maioria dos estudos sobre a microbiota de manguezais caracteriza as mudanças na composição da comunidade microbiana em resposta à contaminação por óleo (SANTOS *et al.* 2011; PEIXOTO *et al.* 2011), tendo como alvos grupos funcionais de bactérias e arqueias (CARMO *et al.* 2011; DIAS *et al.* 2012; VARON-LOPEZ *et al.* 2014), e comparando áreas contaminadas e não contaminadas (MENDES *et al.* 2012; ANDREOTE *et al.* 2012). Considerando os estudos por região, a região sudeste tem a maioria dos estudos publicados enquanto no norte e nordeste ainda há uma escassez de trabalhos (TABELA 3).

Tabela 3 – Estudos em ecologia microbiana em sedimentos de manguezal do Brasil.

Estudo	Técnica empregada	Grupo estudado	Manguezal	Status	Região
Gomes <i>et al.</i> , 2008	DGGE, clonagem e sequenciamento de bandas	Bacteria	Baía de Guanabara, RJ	Antropizado e contaminado por óleo	Sudeste
Dias <i>et al.</i> , 2010	DGGE e biblioteca de clones	Bacteria	Ilha do Cardoso (Cananéia), SP	Pristino	Sudeste
Gomes <i>et al.</i> , 2010	Pirosequenciamento	Bacteria	Baía de Guanabara, RJ	Antropizado e contaminado por óleo	Sudeste
Dias <i>et al.</i> , 2011	DGGE e biblioteca de clones	Archaea	Bertioga e Ilha do Cardoso (Cananéia), SP	Antropizado e contaminado por óleo e pristino, respectivamente	Sudeste
Cleary <i>et al.</i> , 2012	DGGE e pirosequenciamento	Bacteria	Baía de Guanabara, RJ	Contaminado por óleo	Sudeste
Pires <i>et al.</i> , 2012	DGGE e pirosequenciamento	Archaea	Baía de Guanabara, RJ	Antropizado e Contaminado por óleo	Sudeste
Mendes <i>et al.</i> , 2012	T-RFLP e biblioteca de clones	Archaea	Parque Estadual da Ilha do Cardoso, SP	Área antropizada e outra pristina	Sudeste
Andreote, <i>et al.</i> , 2012	Metagenômica (pirosequenciamento)	Archaea e Bacteria	Bertioga e Ilha do Cardoso (Cananéia), SP	Antropizado e contaminado por óleo e pristino, respectivamente	Sudeste
Rigonato <i>et al.</i> , 2013	DGGE, ARISA, qPCR e biblioteca de clones	Cyanobacteria	Bertioga e Ilha do Cardoso (Cananéia), SP	Antropizado e contaminado por óleo e pristino, respectivamente	Sudeste
Pureza <i>et al.</i> , 2013	DHPLC e sequenciamento	Bacteria	Lago Salina, PA	Área artificial criada por	Norte

				construção de rodovia	
Colares; Melo, 2013	DGGE	Archaea e Bacteria	Rio Pacoti, CE	Antropizado	Nordeste
Ribeiro <i>et al.</i> , 2013	ARDRA	Archaea e Bacteria	Baía de Paranaguá e Baía de Laranjeiras, PR	Área Contaminada por óleo e área não contaminada, respectivamente	Sudeste

Embora esses estudos ainda não forneçam uma visão ecológica aprofundada, algumas descobertas são comuns entre eles. O filo Proteobacteria parece ser o mais abundante nos sedimentos de manguezais. Os representantes desse grupo são conhecidos por serem metabolicamente diversos e por desempenharem funções na ciclagem de nutrientes. Este filo possui o maior número das bactérias conhecidas, as quais são todas Gram-negativas e fisiológica e morfológicamente diversas. Filogeneticamente, com base nas sequências do gene RNAr 16S, este grupo se divide em 5 classes: Alpha, Beta, Gamma, Delta e Epsilonproteobacteria, cada uma contendo um grande número de gêneros e espécies (MADIGAN, 2010).

Grupos de micro-organismos responsáveis pela degradação de derivados de petróleo também já foram bem descritos em sedimentos de manguezais e sugerem o grande potencial biotecnológico desses habitats (PEIXOTO *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2011). Em termos de filos, a contaminação com petróleo parece não alterar a predominância de Proteobacteria nos sedimentos, entretanto, quando aprofunda-se a análise para composição de gênero, foram detectadas diferenças em sedimentos contaminados, ressaltando a possibilidade do uso de alguns grupos de bactérias como indicadores de poluição (MACRAE *et al.*, 2013).

2.1.5.1 Bacteria

A maioria dos estudos de ecologia microbiana em sedimentos de manguezal do Brasil caracteriza comunidades de bactérias. Entretanto a maioria desses estudos foca em áreas

contaminadas e seu emprego na biorremediação de petróleo e seus derivados. Por isso, com a exceção de alguns poucos trabalhos, pouco se sabe sobre a diversidade e função de comunidades microbianas em sedimentos de manguezais prístinos.

Gomes *et al.* (2008) foram os primeiros a explorar a estrutura de comunidades de bactérias de sedimentos superficiais de manguezais urbanos usando DGGE em três pontos na Baía de Guanabara, submetidos a diferentes tipos de impactos. Os autores também usaram iniciadores específicos para alguns grupos de bactérias, como *Pseudomonas*, Alpha, Actino e Betaproteobacteria, os quais são conhecidos por estarem envolvidos na degradação de hidrocarbonetos e sequenciaram as bandas mais prevalentes nos géis de DGGE. A análise das sequências obtidas revelou uma maior abundância de populações de bactérias relacionadas com a degradação aeróbica e anaeróbica de hidrocarbonetos especificamente nos pontos de coleta com níveis altos de contaminação por hidrocarbonetos. Eles também provaram que diferentes fontes de poluição por hidrocarbonetos determinam a composição das comunidades bacterianas, mas que a diversidade não necessariamente é reduzida.

A diversidade bacteriana presente nos sedimentos de um manguezal preservado na Ilha do Cardoso, na costa sul do estado de São Paulo, foi determinada por Dias *et al.* (2010), usando métodos independentes de cultivo (DGGE e biblioteca de clones). Os dados revelaram que a comunidade bacteriana é dominada por Alphaproteobacteria (40,36%), Gammaproteobacteria (19,28%) e Acidobacteria, além de outras sequências em menor número, atribuídas aos filos Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes. Análises de redundância (RDA) e os agrupamentos baseados nos perfis obtidos por DGGE foram usados para determinar os fatores que modulam a diversidade das comunidades bacterianas, como profundidade, sazonalidade e localização em um transecto percorrendo desde o mar até o continente. Ambos os grupos dominantes (bactérias em geral e Alphaproteobacteria) e raros (Betaproteobacteria e Actinobacteria) responderam a mudanças nas variáveis ambientais. A localização dos pontos de coleta foi determinante para todas as frações das comunidades estudadas, enquanto que o período de coleta foi significativo para Bacteria, Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria e a profundidade foi determinante para os grupos de Alphaproteobacteria e Actinobacteria.

Andreote *et al.* (2012) foram responsáveis pela descrição do primeiro microbioma em sedimentos de manguezais do Brasil, usando metagenômica, ou seja, a análise do conjunto de genes de um ambiente por meio do isolamento direto do DNA (HANDELSMAN, 2004). Os autores analisaram quatro localidades em dois manguezais distintos no estado de São Paulo submetidos à contaminação por petróleo, impactos antropogênicos (manguezal de Bertioga) e um manguezal não impactado (Cananéia). Examinando a distribuição taxonômica pela análise do gene que codifica para o RNAr 16S os autores encontraram uma grande abundância de Proteobacteria (47,1–56,3%), Firmicutes (10,5–13,8%), Actinobacteria (5,4–12,2%), Bacteroidetes (3,8–11,8%) e Chloroflexi (1,3–5,4%), seguido de outros grupos em menor abundância como Planctomycetes (1,2–3,8%), Cyanobacteria (1,2–3,5%) e Acidobacteria (0,0–2,7%). Nos dois manguezais merece destaque uma maior abundância de Bacteroidetes no manguezal pristino e de Planctomycetes no manguezal antropizado. A reconstrução metabólica *in silico* indicou a ocorrência de processos modulados pelas condições que prevalecem nos sedimentos de manguezais. Os autores encontraram uma prevalência de genes envolvidos no metabolismo do metano, formaldeído e dióxido de carbono. Quanto ao ciclo do nitrogênio, sequências relacionadas com a redução de nitrato, fixação de nitrogênio e desnitrificação. No ciclo do enxofre, foram detectados genes relacionados com a produção de adenilsulfato, sulfito e H₂S. Os dados encontrados pelos autores indicam que há grupos principais envolvidos no ciclo do carbono, nitrogênio e enxofre que são pertencentes às famílias Burkholderiaceae, Planctomycetaceae, Rhodobacteraceae e Desulfobacteraceae. Os autores também compararam as sequências que obtiveram com aquelas obtidas em outros estudos de solos e amostras oceânicas. As amostras de manguezais ficaram em uma posição intermediária às demais amostras incluídas na análise, indicando que os sedimentos de manguezais possuem uma microbiota comum a esses dois ambientes.

Rigonato *et al.* (2013) estudaram a estrutura e os fatores que influenciam as comunidades de cianobactérias em solos dos manguezais de Bertioga (contaminado) e Cananéia (pristino), objetivando examinar os efeitos em longo prazo da contaminação por petróleo nesse grupo, que é um dos principais produtores primários de carbono e nitrogênio em ecossistemas pobres em nutrientes, como os manguezais. Os resultados revelaram que, embora as comunidades de cianobactérias sejam distintas entre os dois manguezais, a estrutura e diversidade das assembleias

de cianobactérias exibem respostas similares aos gradientes ambientais. Em cada ecossistema, as cianobactérias que ocupam áreas próximas à costa foram similares em composição, indicando a importância da influência marinha em estruturar as comunidades. Análises de sequências do gene RNAr 16S revelaram a presença de comunidades diversas de cianobactérias em sedimentos de manguezais, com diferenças claras entre os habitats ao longo de um transecto no sentido costa para o interior da floresta de manguezal. Os autores também encontraram um grande número de sequências novas de cianobactérias, principalmente nos locais previamente expostos a contaminação por petróleo. Este estudo também enfatizou o papel das variáveis ambientais em determinar a estrutura de comunidades de cianobactérias em solos de manguezais e sugere que os impactos antropogênicos podem também atuar como filtros ecológicos que selecionam determinados táxons de cianobactérias.

Pureza *et al.* (2013) foram responsáveis pelo primeiro estudo na região Norte do Brasil, analisando a diversidade bacteriana do lago Salina, um corpo d'água artificial localizado em meio a um manguezal. Os autores analisaram a comunidade bacteriana tanto da água quanto do sedimento em três pontos, usando cromatografia líquida desnatante de alta performance (DHPLC) e sequenciamento. Os grupos mais abundantes foram Proteobacteria e bactérias não classificadas, embora também tenham sido encontrados os filos Bacteroidetes, Cyanobacteria, Acidobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Chloroflexi, Spirochaetes e TM7.

2.1.5.2 Archaea

Em sedimentos de manguezais do Brasil só existem 3 estudos voltados exclusivamente às arqueias. Dias *et al.* (2011) estudaram esse domínio em manguezais contaminados por óleo, impactados por distúrbios antropogênicos e uma área pristina usando DGGE, bibliotecas de clones, além de investigarem o gene *amoA*, relacionado com o ciclo do nitrogênio. Os autores encontraram uma predominância dos filos Thaumarchaeota e Euryarchaeota. Pires *et al.* (2012) investigaram a diversidade de arqueia usando DGGE e pirosequenciamento da região do RNAr 16S em sedimentos sem vegetação e nas rizosferas de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa*. Os autores encontraram um gradiente de riqueza, sendo esta maior na rizosfera de *L. racemosa*, intermediária no sedimento sem vegetação e menor na rizosfera de *R. mangle*. Ambas

as rizosferas tiveram a mesma distribuição de classes, que foi diferente do sedimento sem vegetação. Entretanto a classe Thermoprotei do filo Crenarchaeota foi a classe mais abundante em todos os microhabitats. A riqueza do filo Euryarchaeota foi maior nos sedimentos de rizosfera. Mendes *et al.* (2012) também estudando assembleias de arqueias em áreas pristinas e urbanas em diferentes profundidades (0-10, 10-20, 20-30 e 30-40m) usando T-RFLP e bibliotecas de clones, encontraram diferenças nas comunidades de arqueia relacionadas ao local de amostragem, profundidade e atributos do solo, de acordo com as análises de redundância dos perfis de T-RFLP. Variáveis como pH, matéria orgânica, potássio e magnésio apresentaram correlação significativa com a estrutura geral das comunidades. A análise das sequências mostrou uma mudança na composição das arqueias de acordo com a profundidade. Amostras superficiais apresentaram uma predominância de Euryarchaeota, seguido de Crenarchaeota e Thaumarchaeota, enquanto em amostras mais profundas, Crenarchaeota e Thaumarchaeota foram mais abundantes. Os autores encontraram mais diferenças entre profundidades distintas do que entre as mesmas profundidades em áreas diferentes.

Andreote *et al.* (2012) em sua análise metagenômica de sedimentos de manguezais obtiveram sequências afiliadas com arqueias, principalmente as metanogênicas do filo Euryarchaeota. O manguezal contaminado por óleo (Bertioga) foi o que apresentou uma maior abundância deste domínio, quando comparado ao manguezal pristino (Cananéia).

Outro estudo sobre arqueias em sedimentos de manguezais brasileiros foi realizado por Colares e Melo (2013). As autoras estudaram a estrutura de comunidades de arqueia no sedimento em torno das raízes de *R. mangle* em 3 pontos com distâncias crescentes no sentido mar continente usando DGGE e encontraram resultados semelhante aos de Mendes *et al.* (2012), usando também análise de redundância. Variáveis como matéria orgânica e porcentagens de silte-argila apresentaram correlação positiva significativa com a estrutura geral das comunidades de arqueias.

Ribeiro *et al.* (2013) estudaram arqueias em sedimentos de duas regiões dentro do complexo estuarino de Paranaguá, no estado do Paraná, a baía de Paranaguá (pristina) e a baía de Laranjeiras (contaminada). Os autores mediram a quantidade de hidrocarbonetos alifáticos para determinar o status de contaminação das áreas e analisaram os perfis das comunidades

microbianas por meio da técnica de ARDRA e, apesar das diferenças entre as duas áreas em termos de contaminação, ainda não foram detectadas diferenças nos perfis das comunidades.

2.1.5.3 Interações plantas e micro-organismos

Devido a grande abundância de raízes nos habitats de manguezais, espera-se que o efeito das plantas sobre os micro-organismos (efeito rizosférico) seja de grande importância na manutenção do ecossistema, ciclagem de nutrientes e outras funções fundamentais. Entretanto em zonas intertidais, tais como as florestas de manguezais, que são periodicamente inundadas, não se sabe se a vegetação exerce uma pressão seletiva tão forte como a exercida pelas plantas essencialmente terrestres.

Gomes *et al.* (2010) acessaram a diversidade bacteriana da rizosfera de plântulas transplantadas e de plantas nativas (não transplantadas) no mesmo habitat e compararam com a composição do sedimento sem vegetação, por meio de pirosequenciamento. Os autores evidenciaram uma grande influência das raízes de mangue na abundância e composição de comunidades bacterianas na rizosfera. Cleary *et al.* (2012) também utilizaram o mesmo desenho experimental para validar o DGGE como abordagem para diferenciar a microbiota nas diferentes condições e em diferentes níveis hierárquicos.

Na medida em que a composição e diversidade microbiana influenciam e são influenciados pela vegetação, estes estudos indicaram que as condições das plântulas (nativas ou transplantadas) são fatores que devem ser considerados em projetos de reflorestamento, principalmente em ambientes impactados por desmatamento como os manguezais.

As comunidades de arqueia e bactérias de sedimentos de manguezal se correlacionaram significativamente com a granulometria diferente de três habitats dentro de um manguezal (COLARES; MELO, 2013). Entretanto, mesmo com as diferenças entre os habitats, as comunidades microbianas apresentam uma similaridade geral em torno de 30%, o que foi atribuído ao fato de todas as amostras terem sido coletadas no entorno das raízes de *R. mangle*, sugerindo que a região das raízes possui uma microbiota específica que, a despeito das diferenças de textura dos sedimentos, se estabelece e mantém as funções no entorno das raízes.

Pires *et al.* (2012) foram os primeiros a estudar o efeito rizosférico em comunidades de arqueias em sedimentos de manguezal, encontrando diferenças em composição e riqueza em sedimentos sem vegetação e nas rizosferas, indicando que o entorno das raízes proporciona um habitat específico também para as arqueias.

Tendo este cenário em vista, este estudo teve como objetivo contribuir com o conhecimento da ecologia microbiana em sedimentos de manguezais do Nordeste do Brasil, abrangendo os aspectos temporais e espaciais que governam a ocorrência e a atividade de microorganismos nestes ambientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo descrever a estrutura e a diversidade de comunidades microbianas de sedimentos de manguezais (Pacoti, Ceará, Acaraú e Coreaú) ao longo da costa cearense submetidos a diferentes tipos de impactos antrópicos, tendo um manguezal prístino (Timonha) como referência e comparar as comunidades microbianas nesses ambientes em termos espaciais e temporais por meio de métodos independentes de cultivo.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a composição físico-química de sedimentos de manguezais;
- Analisar a estrutura das comunidades microbianas por meio da técnica de DGGE;
- Correlacionar a ocorrência dos micro-organismos com os fatores ambientais (pH, salinidade, matéria orgânica e granulometria) medidos;
- Fazer uma análise temporal das comunidades microbianas no manguezal do Pacoti;
- Fazer uma análise espacial das comunidades microbianas ao longo da costa cearense em manguezais submetidos a diferentes impactos antrópicos;
- Ter acesso à diversidade das comunidades microbianas por meio de sequenciamento em larga escala.

CAPÍTULO 1 - Estrutura das comunidades de bactérias e arqueias em sedimentos da zona de raiz de *Rhizophora mangle* no manguezal do Rio Pacoti, Ceará: uma série temporal de 5 anos

1.1 INTRODUÇÃO

As comunidades microbianas desempenham um importante papel na ciclagem de nutrientes e processos geoquímicos em solos e sedimentos. Entretanto, não se sabe ainda como a estrutura das comunidades microbianas em sedimentos de manguezal se modifica ao longo do tempo. Entender os padrões temporais e espaciais da diversidade e distribuição das comunidades é uma questão fundamental em ecologia, tendo em vista que esse conhecimento pode contribuir para prever respostas aos impactos e orientar ações de conservação e/ou restauração de ecossistemas impactados (PEREIRA E SILVA *et al.*, 2012).

Em manguezais, as condições ambientais não são homoganeamente distribuídas e esta alta variabilidade pode resultar de fatores locais, bem como regionais. Variações temporais também ocorrem com frequência e estudos têm demonstrado que muitos grupos microbianos funcionais podem apresentar intensas mudanças sazonais em solos (LYNCH *et al.*, 2002).

Vários fatores têm sido descritos como influenciando comunidades microbianas de sedimentos tais como a salinidade, a qualidade da matéria orgânica, o conteúdo de fósforo, os teores de nitrogênio, e tipo de cobertura vegetal (FIERER; JACKSON, 2006). No entanto, determinar quais os fatores são mais importante tem sido difícil devido à interações entre eles. Também foi documentado que a heterogeneidade ambiental afeta a composição da comunidade microbiana mais do que a distância geográfica (PASTERNAK *et al.*, 2013). Variações temporais, mudança climáticas e gradientes de precipitação também foram mostrados como fatores que alteram a diversidade bacteriana e composição da comunidade. Uma abordagem para resolver a questão de qual fator é mais atuante na estrutura da comunidade seria de monitorar alterações ao longo de um gradiente ambiental, como, por exemplo ao longo do curso de um rio (IKENAGA *et al.*, 2009).

A maioria dos trabalhos de monitoramento de comunidades microbianas é feita objetivando-se determinar efeitos de contaminação (SANTOS *et al.*, 2011), práticas de agricultura (MENDES *et al.*, 2014) ou em condições controladas em laboratório (TAKETANI, 2009). Em sedimentos de manguezais há uma escassez de estudos sobre a variação temporal de comunidades microbianas em virtude das variações que ocorrem naturalmente no ambiente.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi de monitorar a estrutura da comunidade microbiana em sedimentos adjacentes às raízes de *Rhizophora mangle* em três pontos distintos com distâncias crescentes no sentido oceano-continente no manguezal do Pacoti, Ceará, nas estações seca e chuvosa ao longo de 5 anos, utilizando-se a técnica de PCR-DGGE para o gene do RNAr 16S. Variáveis ambientais como pH, salinidade, matéria orgânica e conteúdos de silte-argila do sedimento foram medidas e correlacionadas com a ocorrência dos micro-organismos para se avaliar como a dinâmica do ambiente ao longo dos anos afeta a estrutura da comunidade microbiana desses sedimentos.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Área de estudo e coleta do sedimento

Sedimentos da zona de raízes de *R. mangle* do manguezal do Rio Pacoti localizado entre os municípios de Fortaleza, Eusébio e Aquiraz (Região Metropolitana de Fortaleza) foram coletados durante 5 anos (2007-2012) nas estações seca e chuvosa, totalizando 10 amostragens. As médias de chuvas medidas no município de Aquiraz durante os anos de coleta estão representadas na tabela 1.1. Os anos de 2007, 2008 e 2011 apresentaram chuvas dentro da média histórica de 1.333 mm. Os anos de 2010 e 2012 tiveram chuvas abaixo da média, enquanto 2009 apresentou chuvas bem acima da média.

Tabela 1.1 – Média de chuvas no município de Aquiraz entre os anos de 2007-2012.

Ano	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Média histórica
Média de chuva (mm)	1.243	1.563	2.302	774	1.872	701	1.333

Fonte: FUNCEME, 2014.

O sedimento superficial (0-10 cm) foi coletado em 5 replicatas utilizando um amostrador cilíndrico de PVC (30 cm de comprimento, 10 cm de diâmetro) em 3 pontos desde a foz do rio até uma área com maior influência de água doce (FIGURA 1.1) em maré baixa. As amostras foram acondicionadas em frascos estéreis e mantidas em recipiente com gelo até serem levadas ao laboratório, onde foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Já o sedimento destinado para as análises físico-químicas foi acondicionado em sacos plásticos.

Figura 1.1 – Localização dos pontos de coleta no manguezal do Rio Pacoti – CE.



1.2.2 Análises físico-químicas dos sedimentos

Os sedimentos (100 g) foram centrifugados logo após a coleta a 10.000 g por 5 min para a retirada da água intersticial da qual pH e salinidade foram medidas utilizando-se um potenciômetro e um refratômetro, respectivamente. Para as análises granulométricas e medição do teor de matéria orgânica, os sedimentos foram secos em estufa por a 60 °C por 48h. Após a secagem completa, as amostras foram maceradas com auxílio de grau e pistilo e peneiradas para a retirada de pequenos fragmentos de raízes. Os sedimentos secos e macerados foram pesados em triplicatas de 100 g cada e inicialmente lavados em peneira com abertura de malha de 0,062mm 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 0,062mm) por 10 min em um agitador elétrico. 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 o diagrama triangular de Shepard (1954). A determinação do teor de matéria orgânica foi feita pelo método de perda de peso por ignição (PPI), descrita por Schulte e Hopkins (1996). Para tanto, os sedimentos foram postos em cadinhos, previamente secos em dessecador, em triplicatas de 0,5 g. As amostras foram colocadas em mufla a 550 °C por 4h. 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_f é a massa após combustão e M_i, a massa inicial.

1.2.3 Extração de DNA

O DNA total de todas as replicatas das amostras de sedimento foi extraído usando *PowerSoil DNA Isolation Kit* (MO BIO, EUA), com pequenas modificações, que consiste, basicamente, em se pesar aproximadamente 0,25 g de sedimento, que são adicionados a microtubos contendo pequenas esferas. A lise celular ocorre por mecanismos físicos e químicos pela adição de uma solução contendo SDS. Nos passos seguintes, o DNA genômico total a partir de cada amostra é capturado numa membrana de sílica. Na etapa final, o DNA é lavado e, em

seguida, eluído a partir da membrana utilizando 100 uL de água estéril livre de DNase. O DNA extraído foi quantificado utilizando um espectrofotômetro (NanoDrop). As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C.

1.2.4 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 RNAr 16S (ØVREAS *et al.*, 1997). 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. Para o domínio Archaea, foi feita uma primeira amplificação utilizando iniciadores universais para o gene de RNAr 16S de Archaea, 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 durante 5 min, 30 ciclos de 95°C durante 30s, 53°C durante 30s e 72°C durante 1 min e uma extensão final a 72°C durante 10 min. 1 uL dos produtos da primeira amplificação foi utilizado como molde para uma nova amplificação, utilizando iniciadores específicos para a região V3 do RNAr 16S, GC 340F (5' CGC CCG CCG CGC GGC GCG GGC GGG GCG GGG GCA GGG CGG CCG CTA CGG GCA GGY SCA 3') e 519R (5' TTA CCG CGGCKG CTG 3') (DELONG, 1992) de acordo com as seguintes condições: 95 °C durante 5 minutos e 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 53 °C durante 30 s, 72 °C durante 1 min e um período de extensão final a 72 °C durante 6 min. Em todas as reações 10 a 20 ng/mL de DNA total foi utilizado, o que correspondia a um volume de cerca de 1 uL. Todas as reações foram de 25 uL e continham: 0,5 pmol de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, 2,5 ul de tampão de PCR 10 × (100 mM Tris - HCl e KCl 500 mM, pH 9,0), MgCl₂ 1,5 mM e 5U de Taq DNA polimerase e água ultrapura Milli-Q esterilizada para atingir o volume final. Os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com SYBR Safe (Invitrogen), em tampão TBE 0,5 x (45 mM de Tris base, 45 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA pH 8,0), utilizando um sistema de fotodocumentação ultravioleta. O marcador molecular de 1 Kb foi utilizado como

padrão de tamanho de DNA. Os amplicons foram então separados por DGGE. Os géis de acrilamida a 8% foram preparadas com o desnaturante nos gradientes de 30 a 65% usando uma solução de 100% desnaturante (ureia 7 M e formamida a 40%) e uma solução a 0% (sem ureia ou formamida). A eletroforese correu constantemente a 60°C e 200 V durante 4 h em um sistema DCode (BioRad, EUA) em 0,5 × tampão TAE (acetato de Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Após a eletroforese, os géis foram corados com SYBR -Green I (Molecular Probes) e da imagem do gel foi capturado em um sistema de documentação fotográfica ultravioleta.

1.2.5 Análise dos Dados

Análise de Componentes Principais (PCA) foi usada para discriminar padrões gerais de variáveis ambientais entre todas as amostras utilizando o programa PAST 2.12 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). O programa BioNumerics (Applied Maths, Sint -Martens- Latem, Bélgica) foi utilizado para normalizar, comparar e converter as imagens dos géis de DGGE em matrizes de abundância e presença/ausência das quais foram originados os agrupamentos hierárquicos usando o algoritmo UPGMA e a distância de Jaccard utilizando o programa PRIMER 6 (CLARKE; GORLEY, 2006). A significância dos grupos formados foi testada utilizando a análise de similaridade de perfil (SIMPROF) com 999 permutações e nível de significância de $p < 0,05$ (CLARKE; GORLEY, 2006). As matrizes geradas pelo BioNumerics também foram utilizadas para correlacionar a ocorrência das espécies com os dados ambientais por meio da análise de redundância (RDA), usando Canoco versão 4.5 (Biometris, Wageningen, Holanda). Este método de análise estatística foi escolhido de acordo com uma análise prévia da distribuição dos dados determinados por análise de correspondência destendenciada (DCA) que mostrou uma distribuição linear de espécies. A fim de examinar o significado de cada um dos fatores ambientais na composição das espécies nas amostras, testes de Monte Carlo com 499 permutações foram realizados (RAMETTE, 2007).

1.3 RESULTADOS

Os valores das variáveis ambientais (pH e salinidade) e características dos sedimentos (matéria orgânica, fração silte-argila e classificação granulométrica) nos 3 pontos de coleta, nos períodos seco e chuvoso ao longo dos 5 anos de amostragem estão apresentados na tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Variáveis ambientais dos pontos e períodos de coleta e características gerais dos sedimentos.

Amostra	Ponto	Estação	Ano	pH	Salinidade	Matéria Orgânica (g/Kg)	Silte-Argila (%)	Classificação
PAC 1 S1	1	Seca	1	7,49	47	39,04	21,45	Areia
PAC 2 S1	2	Seca	1	7,26	53	99,48	43,84	Areia lamosa
PAC 3 S1	3	Seca	1	6,41	40	107,11	94,00	Lama
PAC 1 C1	1	Chuvosa	1	7,43	34	105,22	71,86	Lama arenosa
PAC 2 C1	2	Chuvosa	1	7,65	35	70,82	35,81	Areia lamosa
PAC 3 C1	3	Chuvosa	1	7,27	8	114,88	92,47	Lama
PAC 1 S2	1	Seca	2	6,80	47	32,91	18,38	Areia
PAC 2 S2	2	Seca	2	7,36	46	57,66	33,08	Areia lamosa
PAC 3 S2	3	Seca	2	6,70	34	155,31	93,98	Lama
PAC 1 C2	1	Chuvosa	2	6,98	26	32,63	16,17	Areia
PAC 2 C2	2	Chuvosa	2	7,69	25	55,16	27,77	Areia lamosa
PAC 3 C2	3	Chuvosa	2	7,57	6	124,13	93,21	Lama
PAC 1 S3	1	Seca	3	6,80	48	77,70	36,70	Areia lamosa
PAC 2 S3	2	Seca	3	7,36	50	131,00	42,28	Areia lamosa
PAC 3 S3	3	Seca	3	6,70	26	177,20	97,10	Lama
PAC 1 C3	1	Chuvosa	3	7,23	40	76,82	26,60	Areia lamosa
PAC 2 C3	2	Chuvosa	3	7,19	34	67,23	42,44	Areia lamosa
PAC 3 C3	3	Chuvosa	3	6,74	4	152,57	93,95	Lama

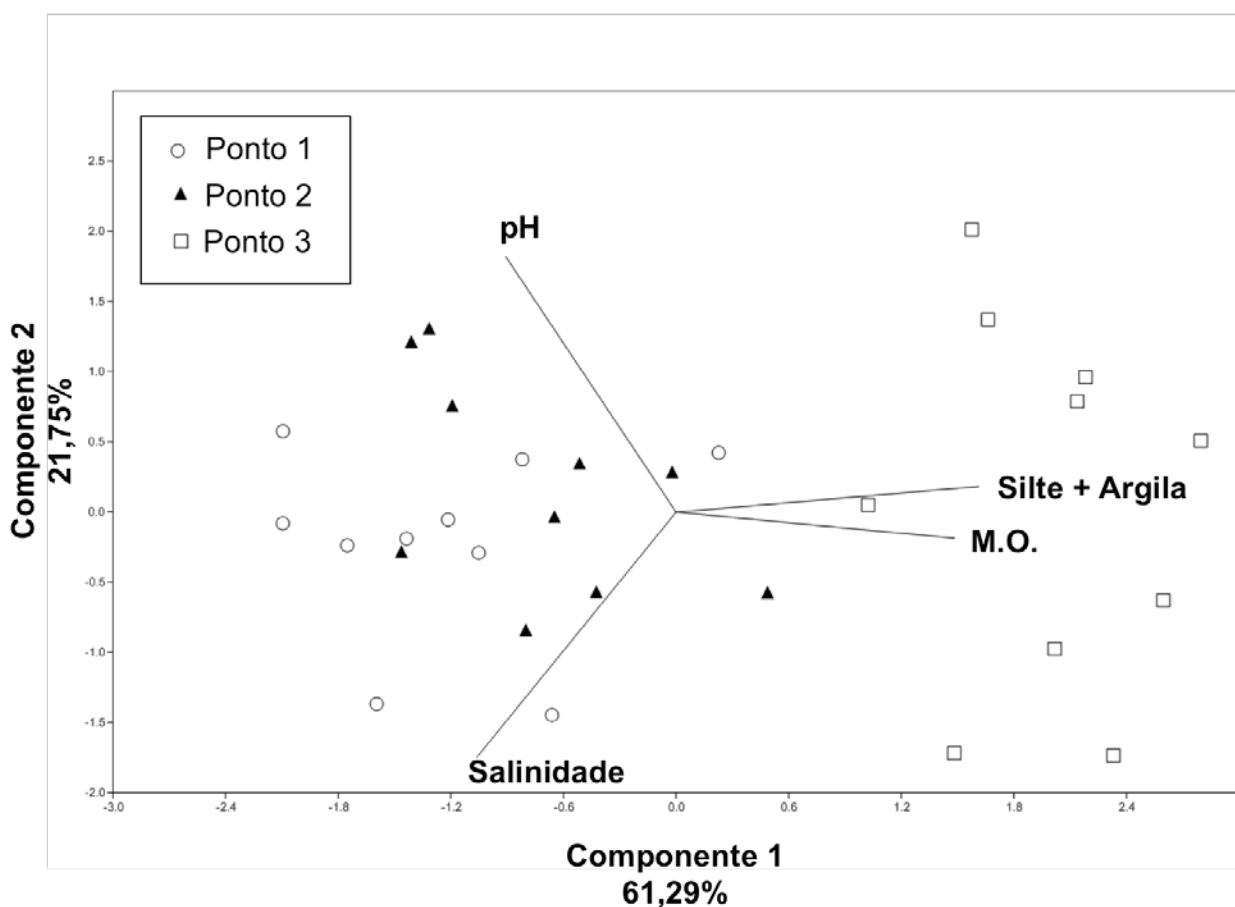
PAC 1 S4	1	Seca	4	7,60	41	92,38	46,29	Areia lamosa
PAC 2 S4	2	Seca	4	7,93	37	66,68	43,39	Areia lamosa
PAC 3 S4	3	Seca	4	7,48	43	159,43	90,81	Lama
PAC 1 C4	1	Chuvosa	4	7,27	40	56,16	22,90	Areia
PAC 2 C4	2	Chuvosa	4	7,12	25	69,43	56,08	Lama arenosa
PAC 3 C4	3	Chuvosa	4	6,88	5	113,38	94,75	Lama
PAC 1 S5	1	Seca	5	7,23	40	34,91	19,31	Areia
PAC 2 S5	2	Seca	5	7,25	47	137,55	73,64	Lama arenosa
PAC 3 S5	3	Seca	5	6,26	33	145,74	94,01	Lama
PAC 1 C5	1	Chuvosa	5	7,64	39	35,43	19,52	Areia
PAC 2 C5	2	Chuvosa	5	7,48	37	91,50	50,77	Lama arenosa
PAC 3 C5	3	Chuvosa	5	7,10	9	143,37	93,21	Lama

Pela observação dos dados da tabela 1.2 é possível afirmar 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 neutro, com valores de pH dos três pontos variando de 6,4 a 7,9; não ocorrendo grandes variações entre os pontos e períodos analisados. Quanto a classificação do sedimento, esta variou dentro do espectro areia-lama, tendo o ponto 3 sido classificado como lama em todas as coletas, enquanto ponto 1 e ponto 2 variaram de areia, areia lamosa a lama arenosa e de areia lamosa a lama arenosa, respectivamente. O ponto 3 apresentou teores de matéria orgânica e silte-argila mais elevados do que nos pontos 1 e 2, mais próximos ao mar, porém é possível detectar um aumento no conteúdo de silte-argila e matéria orgânica no ponto 1 na coleta C1, pois acredita-se que a chuva que ocorreu no dia anterior à coleta tenha carregado sedimentos rio abaixo. A alta pluviosidade registrada em 2009 (TABELA 1.1), período anterior à coleta S3, que foi acima da média, provavelmente influenciou nos maiores teores de matéria orgânica e silte-argila dos solos do pontos 1 nas coletas seguintes, tendo, no último ano voltado a valores semelhantes aos das primeiras coletas.

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para visualizar a variabilidade dos dados ambientais, revelando os principais fatores responsáveis para explicar mais de 80% da

variabilidade total dentro do conjunto de dados (FIGURA 1.2). O componente 1, que explicou mais de 61% da variabilidade total, foi positivamente correlacionado com a matéria orgânica e conteúdo de silte-argila, mostrando uma forte relação entre esses dois fatores. As amostras do ponto 3, que tiveram os maiores valores dessas duas variáveis, estão correlacionadas positivamente com este eixo, enquanto as amostras dos pontos 1 e 2, que apresentaram os menores valores, correlacionaram negativamente com este eixo. O Componente 2, que explicou mais de 26% da variabilidade total, foi positivamente correlacionada com pH e negativamente com a salinidade. Em geral, é possível constatar dois grupos no PCA, um grupo formado pelos pontos 1 e 2, outro pelas amostras do ponto 3.

Figura 1.2 – Análise de PCA mostrando a variabilidade dos dados ambientais nas 30 amostras de sedimentos do manguezal do Pacoti, Ceará.



Analisando a riqueza dos ribotipos, ou seja, o número de bandas no DGGE, pode-se observar que para Bacteria (TABELA 1.3) o número de bandas nos géis variou de 10 a 29, tendo o ponto 3 exibido a menor média de riqueza. Para os géis de Archaea (TABELA 1.4), o número de bandas variou de 14 a 38, tendo sido observada também no ponto 3 a menor média de riqueza ao longo dos 5 anos de monitoramento.

Tabela 1.3 – Riqueza de ribotipos de Bacteria detectados por DGGE.

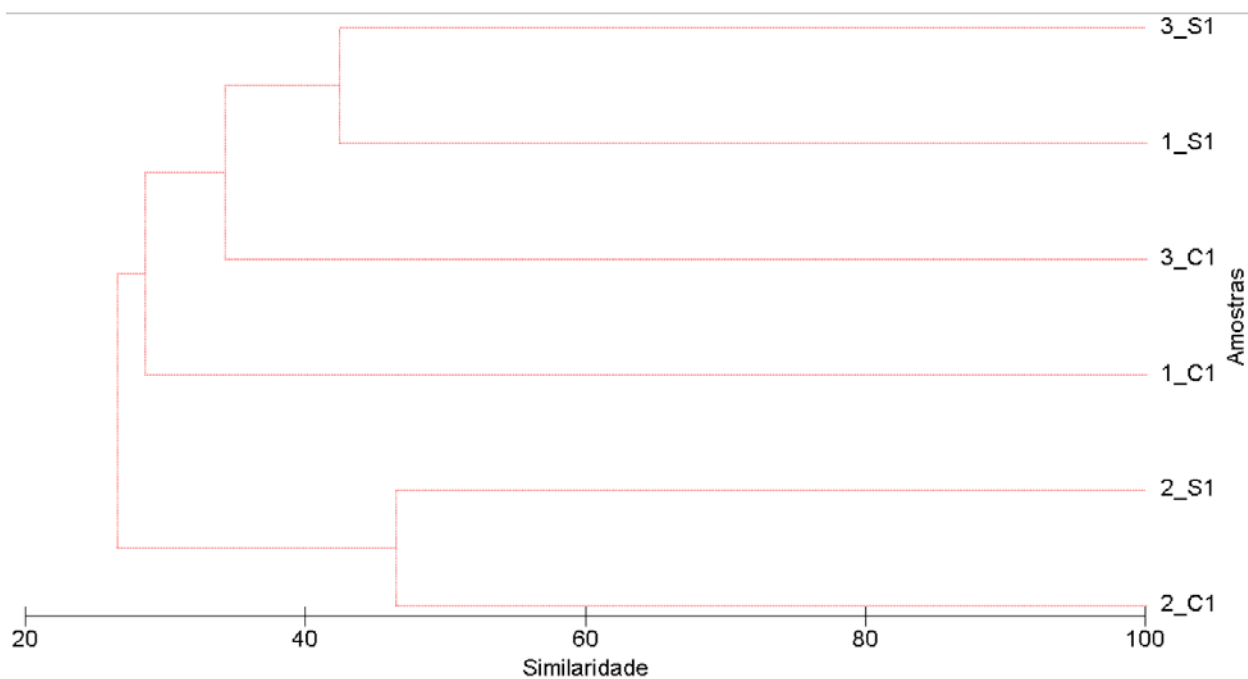
	Ano 1		Ano 2		Ano 3		Ano 4		Ano 5		Média
Ponto 1	1 S1	1 C1	1 S2	1 C2	1 S3	1 C3	1 S4	1 C4	1 S5	1 C5	23,1
Riqueza	28	17	18	18	22	29	28	18	26	27	
Ponto 2	2 S1	2 C1	2 S2	2 C2	2 S3	2 C3	2 S4	2 C4	2 S5	2 C5	23
Riqueza	21	20	25	19	23	26	23	27	24	22	
Ponto 3	3 S1	3 C1	3 S2	3 C2	3 S3	3 C3	3 S4	3 C4	3 S5	3 C5	19,9
Riqueza	19	18	20	20	16	10	26	27	22	21	

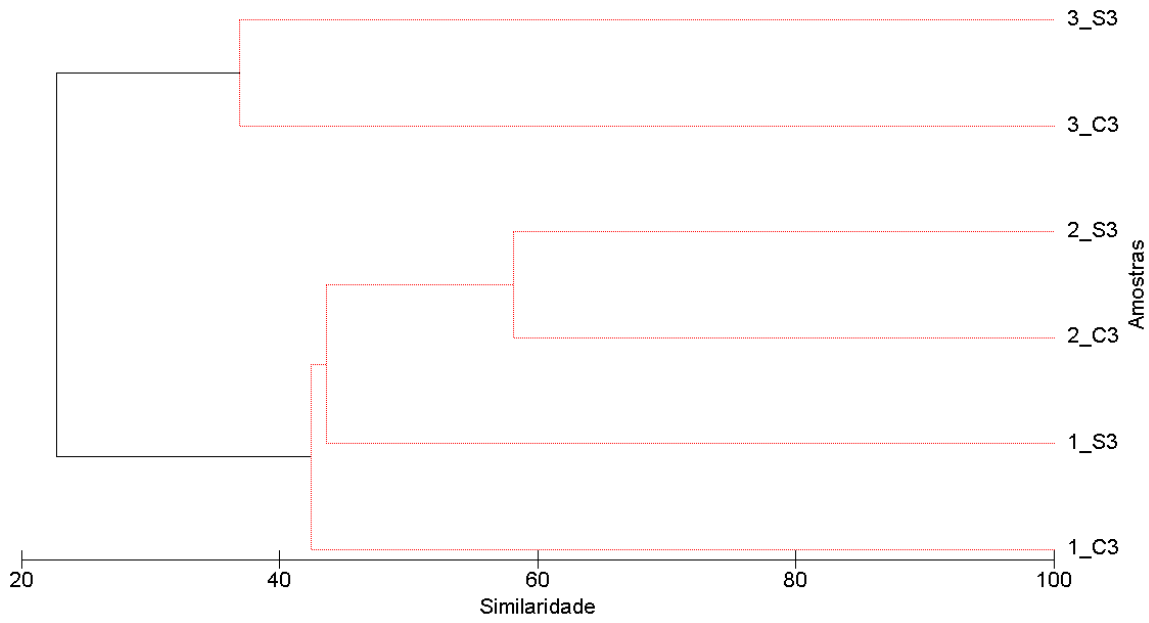
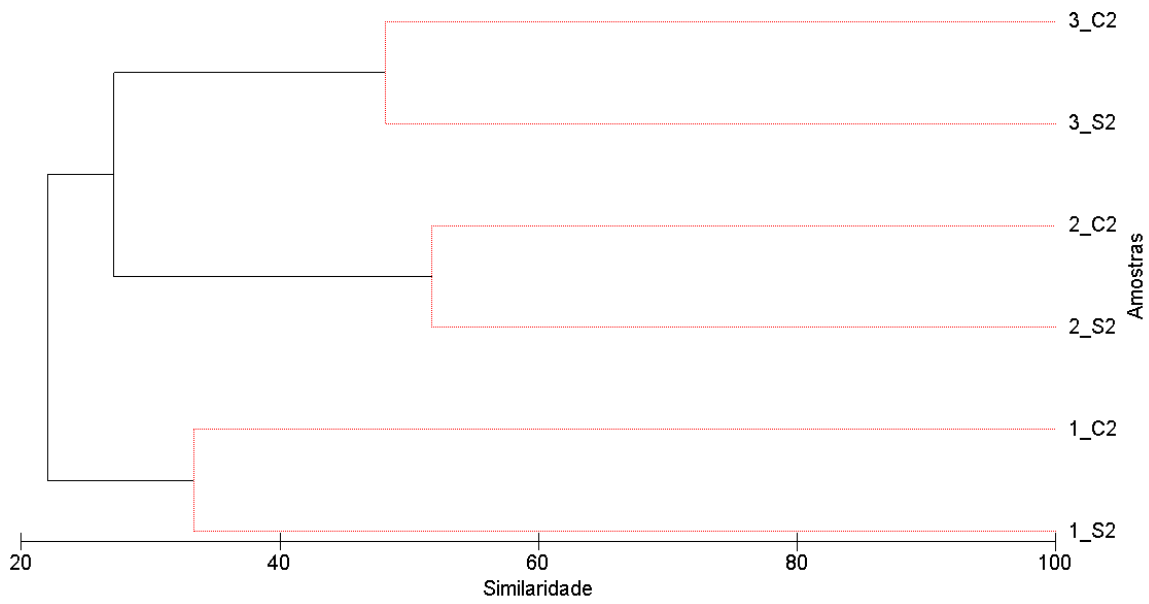
Tabela 1.4 – Riqueza de ribotipos de Archaea detectados por DGGE.

	Ano 1		Ano 2		Ano 3		Ano 4		Ano 5		Média
Ponto 1	1 S1	1 C1	1 S2	1 C2	1 S3	1 C3	1 S4	1 C4	1 S5	1 C5	25,5
Riqueza	26	22	24	25	17	32	26	26	28	29	
Ponto 2	2 S1	2 C1	2 S2	2 C2	2 S3	2 C3	2 S4	2 C4	2 S5	2 C5	29,3
Riqueza	29	28	27	26	22	32	30	24	38	37	
Ponto 3	3 S1	3 C1	3 S2	3 C2	3 S3	3 C3	3 S4	3 C4	3 S5	3 C5	17,5
Riqueza	18	14	17	20	16	19	19	19	22	30	

Analisando os agrupamentos derivados dos perfis de DGGE para as comunidades bacterianas (FIGURA 1.3), nota-se que os pontos se agruparam de forma bastante variável ao longo dos anos, tendo o mesmo acontecido para as comunidades de arqueia (FIGURA 1.4) Com relação à similaridade entre os 3 pontos, esta foi em torno de 20% nos primeiros anos de monitoramento, aumentando nos últimos 2 anos tanto para bactérias e no último ano para as arqueias.

Figura 1.3 – Agrupamentos em função das estruturas de comunidades de bactérias obtidas a partir dos perfis de DGGE utilizando o algoritmo UPGMA e a distância de Jaccard ao longo dos 5 anos. Foram incluídas na análise as amostras dos 3 pontos de coleta e das duas estações (seca, anos 1 ao 5; S1 ao S5) e (chuvosa, anos 1 ao 5; C1 ao C5). A parte em preto nos agrupamentos indica aqueles que atingiram significância ($p < 0,05$).





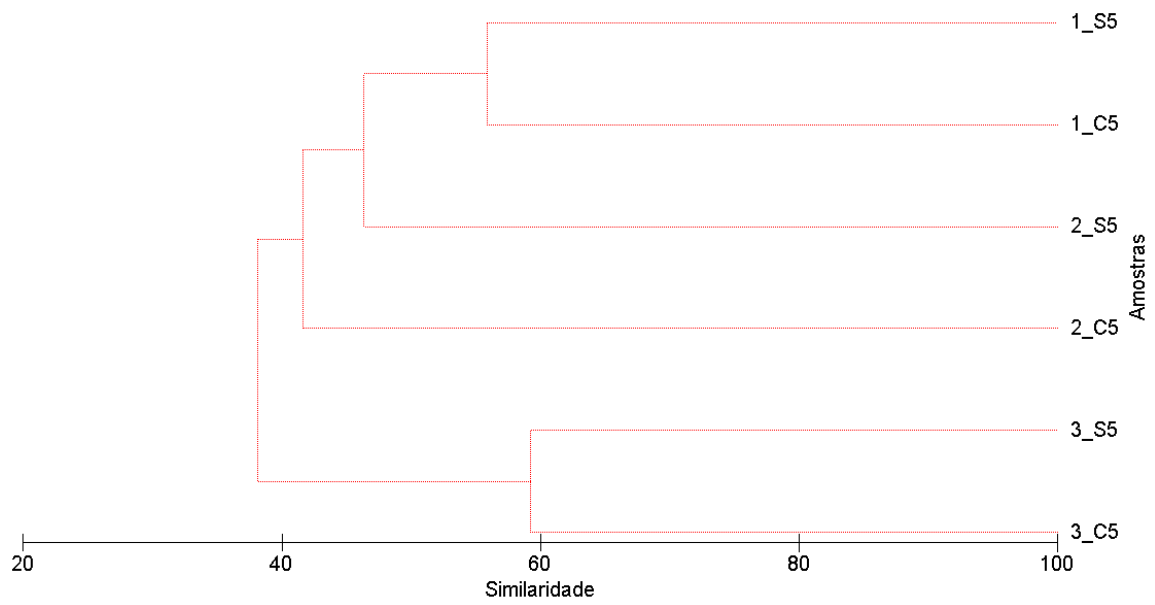
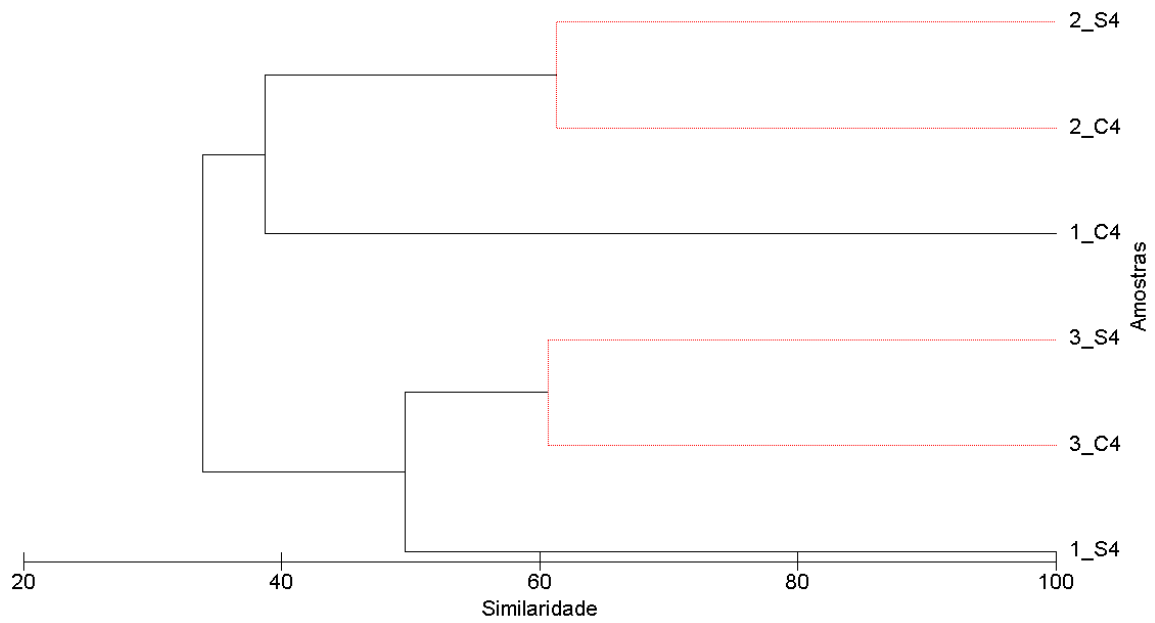
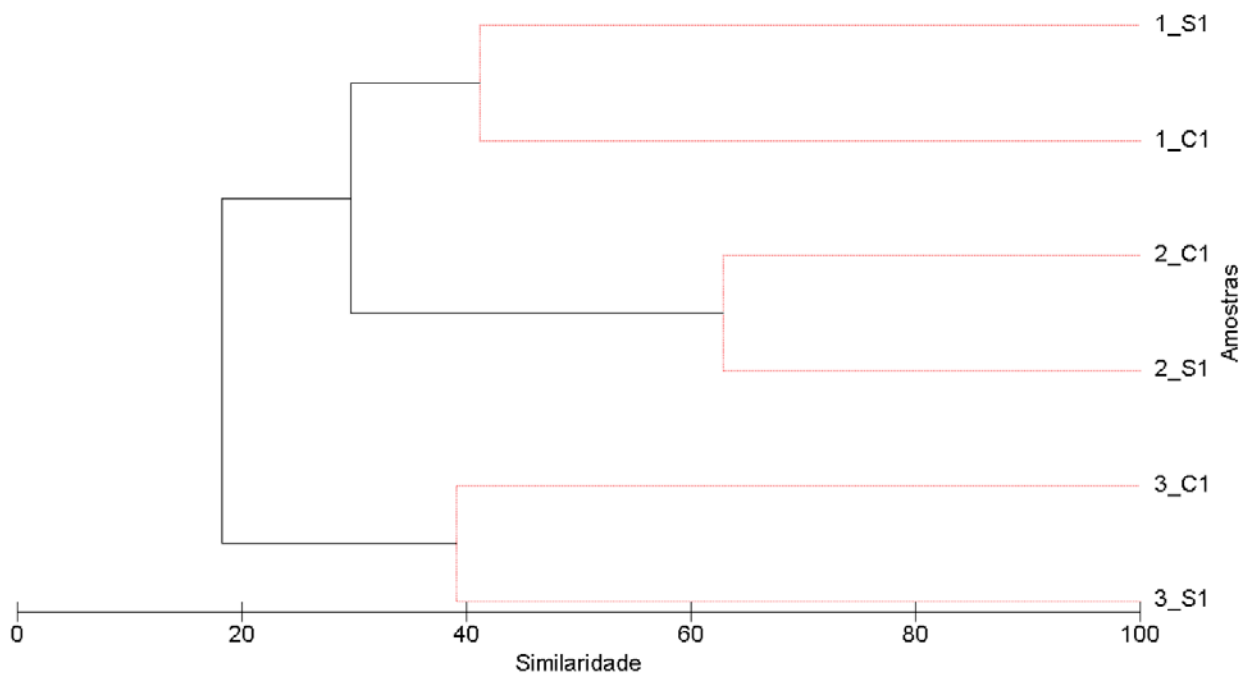
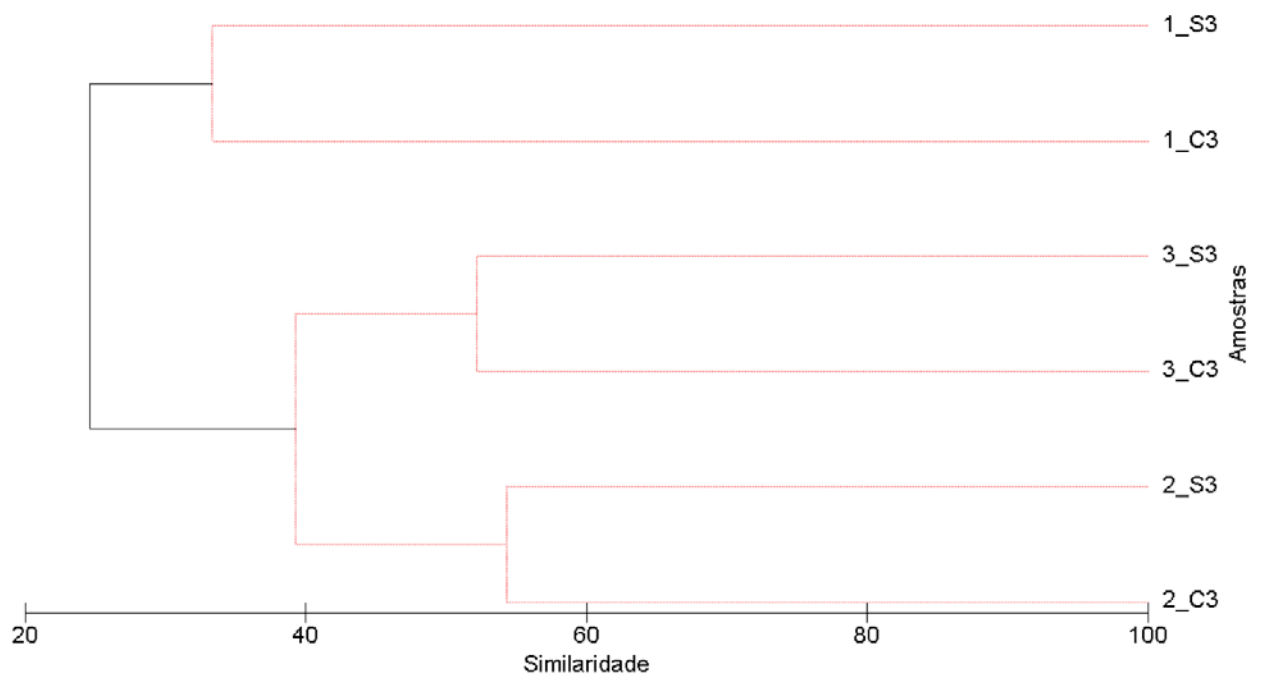
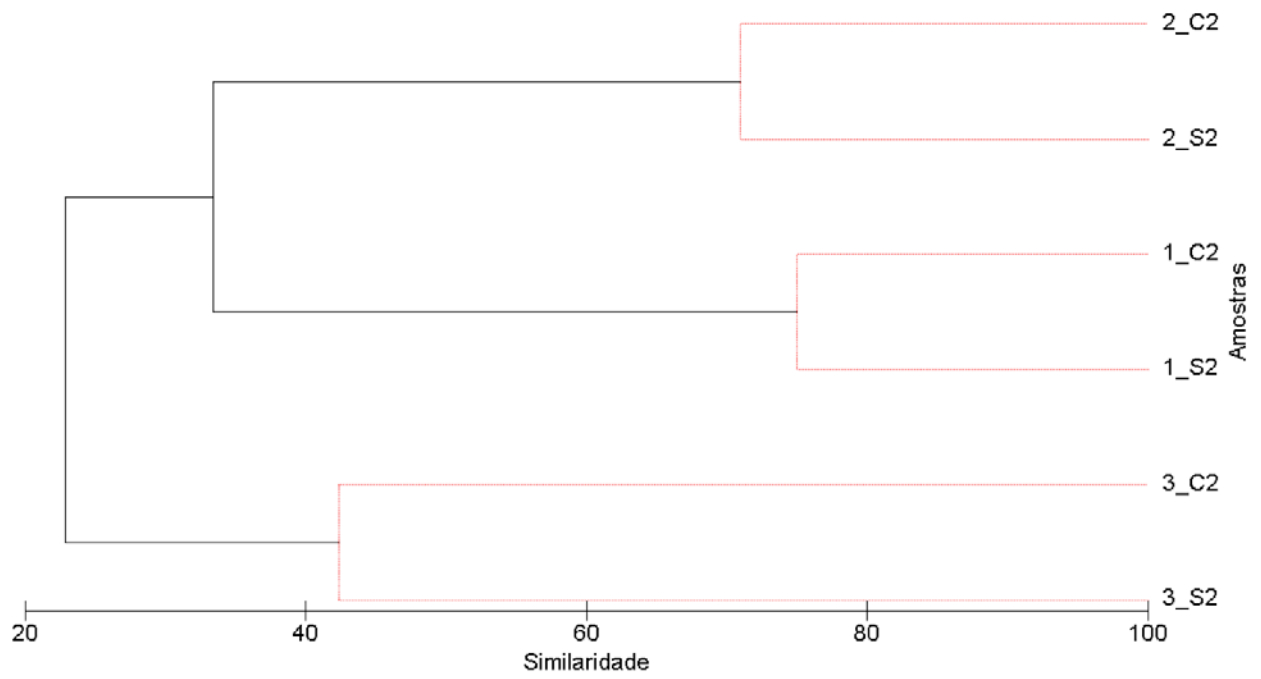
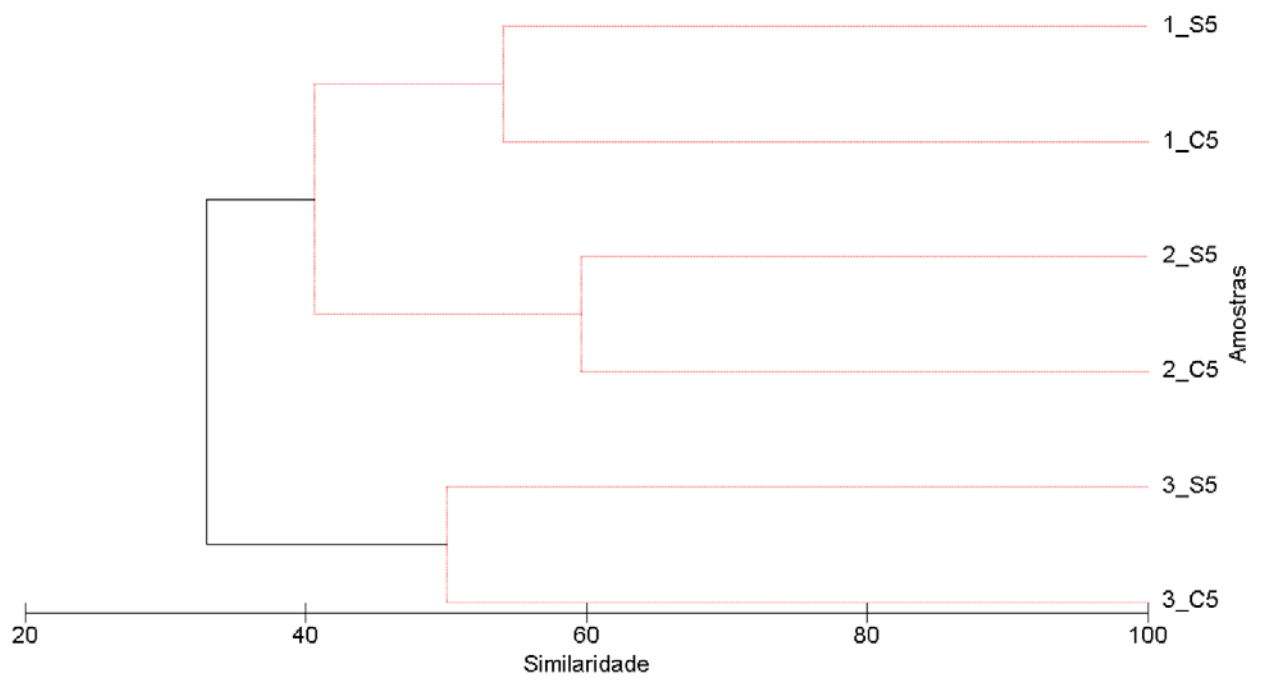
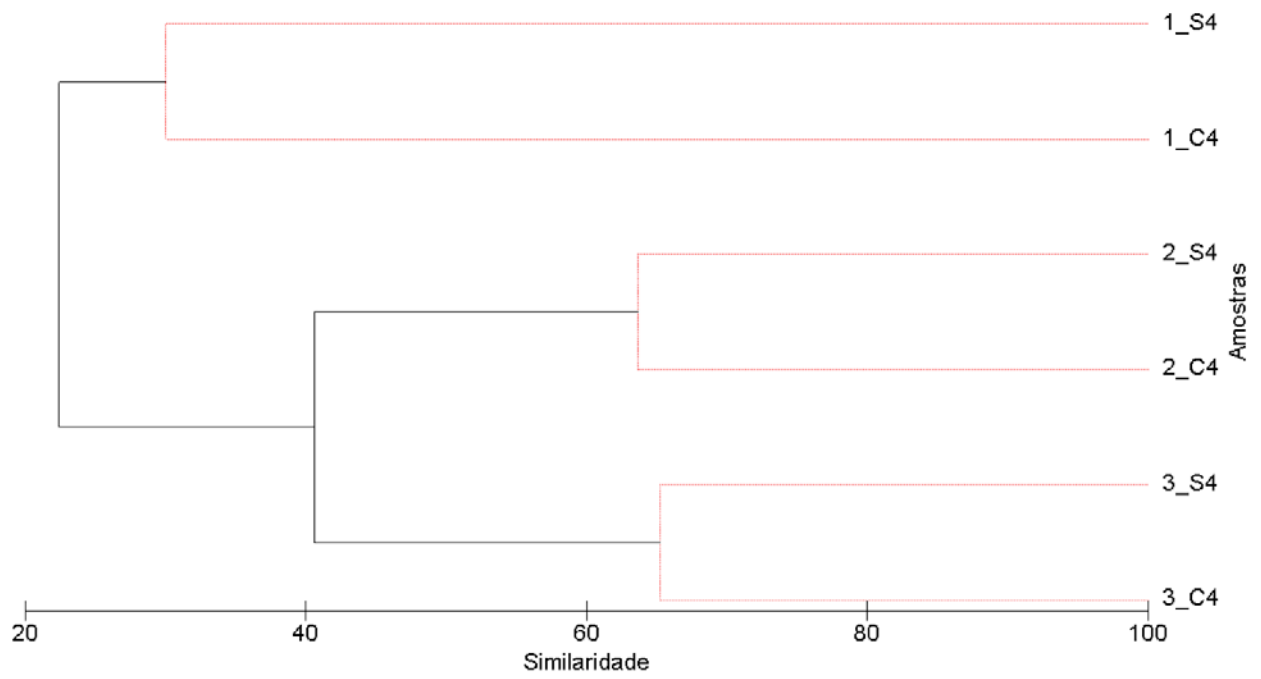


Figura 1.4 – Agrupamentos em função das estruturas de comunidades de arqueias obtidas a partir dos perfis de DGGE utilizando o algoritmo UPGMA e a distância de Jaccard ao longo dos 5 anos. Foram incluídas na análise as amostras dos 3 pontos de coleta e das duas estações (seca, anos 1 ao 5; S1 ao S5) e (chuvosa, anos 1 ao 5; C1 ao C5). A parte em preto nos agrupamentos indica aqueles que atingiram significância ($p < 0,05$).







Nas tabelas 1.5 e 1.6 estão representados os valores obtidos na Análise de Redundância (RDA), a qual foi utilizada para ajudar a revelar os principais descritores da estrutura da comunidade microbiana nos sedimentos do manguezal do rio Pacoti ao longo dos 5 anos de monitoramento.

Efeitos marginais e condicionais foram analisados. O primeiro reflete o percentual de variância (LambdaA) explicado por apenas uma variável, enquanto as outras são omitidas. O último refere-se ao percentual de variância (Lambda1) que foi explicado por uma variável quando as outras também são consideradas no modelo. As tabelas 1.5 e 1.6 mostram a variância explicada por cada fator e os valores de p.

Observando os valores obtidos para as comunidades de Bacteria, o conteúdo de silte-argila explicou a maior parte da variância ao longo da maioria dos anos de monitoramento, entretanto essa variável influenciou significativamente ($p < 0,05$) a estrutura das comunidades bacterianas somente no ano 3 de monitoramento. Vale ressaltar também que no ano 5 a salinidade influenciou significativamente a estrutura das comunidades de Bacteria.

Para as arqueias, os percentuais de silte-argila também explicaram a maior parte da variabilidade dos dados, porém essa variável só influenciou a comunidade de arqueia de forma significativa ($p < 0,05$) no ano 5 do monitoramento.

Tabela 1.5 – Efeitos de variáveis ambientais sobre a comunidade de Bacteria em sedimentos do manguezal do Pacoti ao longo dos 5 anos por Análise de Redundância (RDA).

			pH	Salinidade	Matéria Orgânica	Silte-Argila
Ano 1	Efeito marginal	Lambda1	0,20	0,19	0,20	0,23
	Efeito condicional	LambdaA p	0,18 0,514	0,18 0,496	0,23 0,246	0,23 0,282
Ano 2	Efeito marginal	Lambda1	0,22	0,20	0,28	0,29
	Efeito condicional	LambdaA p	0,22 0,284	0,21 0,306	0,10 0,634	0,29 0,15
Ano 3	Efeito marginal	Lambda1	0,26	0,31	0,28	0,36
	Efeito condicional	LambdaA p	0,17 0,392	0,15 0,518	0,18 0,442	0,36 0,004*
Ano 4	Efeito marginal	Lambda1	0,14	0,15	0,28	0,25
	Efeito condicional	LambdaA p	0,10 0,644	0,26 0,176	0,28 0,120	0,18 0,454
Ano 5	Efeito marginal	Lambda1	0,20	0,28	0,26	0,27
	Efeito Condicional	LambdaA p	0,16 0,546	0,28 0,004*	0,21 0,200	0,16 0,542

*Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Tabela 1.6 – Efeitos de variáveis ambientais sobre a comunidade de Archaea em sedimentos do manguezal do Pacoti ao longo dos 5 anos explicados por Análise de Redundância (RDA).

			pH	Salinidade	Matéria Orgânica	Silte-Argila
Ano 1	Efeito marginal	Lambda1	0,22	0,20	0,21	0,29
	Efeito condicional	LambdaA p	0,12 0,666	0,19 0,446	0,23 0,210	0,29 0,086
Ano 2	Efeito marginal	Lambda1	0,27	0,21	0,36	0,36
	Efeito condicional	LambdaA p	0,28 0,140	0,18 0,208	0,12 0,350	0,36 0,096
Ano 3	Efeito marginal	Lambda1	0,23	0,17	0,24	0,26
	Efeito condicional	LambdaA p	0,23 0,260	0,16 0,532	0,17 0,472	0,26 0,186
Ano 4	Efeito marginal	Lambda1	0,17	0,17	0,23	0,31
	Efeito condicional	LambdaA p	0,18 0,612	0,19 0,490	0,21 0,476	0,31 0,112
Ano 5	Efeito marginal	Lambda1	0,24	0,20	0,33	0,33
	Efeito Condicional	LambdaA p	0,06 0,524	0,13 0,484	0,13 0,106	0,09 0,014*

*Valores estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

1.4 DISCUSSÃO

Neste trabalho as comunidades de bactérias e arqueias que colonizam o sedimento na zona de raízes de *Rhizophora mangle* foram monitoradas nas estações seca e chuvosa ao longo de 5 anos em 3 pontos com distâncias crescentes no sentido oceano-continente utilizando a técnica de PCR-DGGE. Variáveis ambientais como pH, salinidade, conteúdos de matéria orgânica e silte-argila dos sedimentos também foram medidas ao longo dos anos de coleta e testadas quanto a sua correlação com a estrutura dos micro-organismos nestes sedimentos.

Analisando as variáveis ambientais ao longo dos anos foi observado que pH não variou significativamente, enquanto a salinidade caiu no período chuvoso, principalmente no ponto 3, o mais distante do mar. A maior variação da salinidade neste ponto de coleta se deve à maior influência de água doce no período chuvoso.

O manguezal do Pacoti, tal como os demais manguezais do nordeste brasileiro, está sob influência do clima semiárido, no qual a maioria dos rios está fortemente modulada pela sazonalidade seca/chuvosa. As mudanças no uso da terra ao longo da bacia deste rio, principalmente com a construção de barragens, acentua a drástica redução no suprimento de água doce e acúmulo de sedimento na foz do rio, fazendo com que haja um aumento da área que está sob a influência de água salgada o que pode estar relacionado ao aumento da área deste manguezal nos últimos 46 anos (LACERDA *et al.*, 2007).

Os valores de matéria orgânica e silte-argila foram maiores no ponto 3 e geralmente menores do ponto 1. Esses resultados podem ser explicados pela maior distância do ponto 3 do mar, estando sujeito a um menor hidrodinamismo, possibilitando a deposição de sedimentos finos. Este sedimento, por sua vez, retém mais matéria orgânica. Prasad; Ramanathan (2008) também detectaram que os sedimentos dentro de florestas de manguezais têm conteúdos mais altos de matéria orgânica do que sedimentos estuarinos.

A diferença entre as variáveis ambientais medidas nos pontos de coleta foi bem visualizada na dispersão obtida na PCA, na qual os pontos 1 e 2 ficaram no mesmo quadrante, enquanto o ponto 3 ficou em outro quadrante, correlacionado com altos valores de matéria orgânica e silte-argila.

A técnica de PCR-DGGE foi usada para monitorar as comunidades de bactérias e arqueias ao longo dos 5 anos de estudo. Esta técnica já foi usada em inúmeros trabalhos como uma ferramenta rápida e menos dispendiosa de se obter um perfil instantâneo de comunidades microbianas em diversos tipos de ambientes (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993; ØVREAS *et al.*, 1997).

Por meio da contagem do número de bandas que aparecem em um perfil de DGGE pode ser calculada a riqueza de ribotipos presentes em uma amostra. Neste trabalho, a riqueza de arqueias encontrada 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, para uma comunidade complexa, como, por exemplo, a do solo, pode-se ter numerosas populações em proporções relativamente equivalentes, deste modo, resultando em um “borrado” de bandas o que torna difícil a identificação de populações individuais (NAKATSU; TORSVIK; ØVREAS, 2000). No presente estudo, os géis de Bacteria apresentaram muitas bandas que não se resolveram havendo uma subestimação da riqueza de ribotipos, enquanto que nos géis de Archaea as bandas ficaram mais bem resolvidas, pela menor quantidade de ribotipos, dando a impressão de que a riqueza de Archaea seria maior.

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 toda a diversidade na maioria das amostras de solo.

O ponto 3, que possui os sedimentos com os maiores teores de silte-argila, também apresentou a menor média de riqueza ao longo dos anos tanto para comunidades de bactéria como para arqueias. Este resultado contrasta com outros estudos que têm demonstrado que a biomassa microbiana concentra-se principalmente nas frações silte-argila (SESSITSCH *et al.*, 2001). Em sedimentos marinhos próximo a uma floresta de manguezal tropical, a abundância de populações mostrou significativas diferenças sazonais e espaciais e as maiores densidades estavam correlacionadas com o tamanho de partícula menor dos sedimentos (ALONGI *et al.*, 1989).

No entanto, Gonzalez-Acosta *et al.* (2006) afirmam que essa relação com o tamanho da partícula se mostrou inconsistente nos seus estudos em sedimentos de manguezal no México sugerindo que o fatores que controlam a dinâmica da comunidade microbiana do solo são complexos e estão relacionados a outros fatores bióticos e abióticos, tais como a disponibilidade de recursos, a competição, a predação e variabilidade de condições físico-químicas.

A grande variação observada nas análises do padrão de agrupamento das comunidades microbianas derivadas do DGGE ao longo dos 5 anos de monitoramento demonstra a dinâmica dessas comunidades ao longo do tempo.

No mundo microbiano, o tempo é acelerado em relação a nossa experiência. Uma combinação de tempos curtos de geração, rápido potencial evolutivo, e grandes relações superfície/volume conferem aos micro-organismos do solo vantagens sobre plantas e animais em termos de rapidez com que podem processar os recursos e se adaptar às mudanças em ambientes naturais. Deste modo, os micro-organismos têm a capacidade para perceber e responder a alterações ambientais em uma escala de tempo muito mais rápida do que as plantas e animais. Por exemplo, os micro-organismos podem sentir a mudança de gradientes de limitação de recursos em termos de segundos a minutos, permitindo-lhes sair de estados de dormência e até mesmo se mover ao longo de gradientes ambientais em poucos minutos em resposta a pulsos de limitação de recursos (LIPSON *et al.*, 2002)

As implicações dessa escala de tempo são especialmente importantes no microambiente do solo. Os solos compreendem os ambientes mais espacial e temporalmente heterogêneos na Terra, uma combinação de estrutura física e geoquímica complexas com flutuações sazonais de temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes. Portanto, não é surpresa que os solos têm uma maior diversidade e biomassa dos micro-organismos em comparação com outros ambientes (TORSVIK; ØVREÅS; THINGSTAD, 2002).

As comunidades microbianas podem sofrer mudanças sucessionais em escalas de tempo de menos de um ano. Este é uma hipótese que vem desde a década de 1950, porém estudos recentes vem comprovando esta teoria. A sucessão microbiana em solos que recentemente sofreram derretimento apoia a ideia de que as comunidades microbianas podem mostrar mudanças sucessionais em escalas de tempo muito mais curtos do que a sucessão das comunidades vegetais (LIPSON *et al.*, 2002).

Lipson *et al.* (2002) estudando sucessão sazonal em solos alpinos indicaram que muitos grupos funcionais microbianos mostram mudanças sazonais dramáticas. De acordo com medidas independentes de biomassa e atividade enzimática os autores viram que a comunidade microbiana que se desenvolve no verão é alimentada principalmente por rizodeposição e a disponibilidade do substrato e os dados da atividade das enzimas indicam que existe uma sucessão anual de substratos dominantes para o crescimento microbiano progredindo a partir de polímeros de carbono/fenólicos (inverno) para proteínas (degelo) para rizodeposição (verão).

Evidências de sucessão de comunidades microbianas também chegaram recentemente de estudos moleculares das comunidades da rizosfera (SMALLA *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2003). A rizosfera é um ambiente muito dinâmico, que recebe grandes entradas de substratos de carbono a partir de plantas.

Neste trabalho, apesar da grande variabilidade observada nos agrupamentos e nos fatores abióticos, os pontos de coleta ao longo dos anos apresentaram ainda uma similaridade em torno de 20% nos agrupamentos, aumentando nos dois últimos anos de coleta, tanto para bactérias como para arqueias. Essa similaridade entre as comunidades microbianas nos pontos de coleta já havia sido observada nos 2 primeiros anos de monitoramento e isso foi atribuído ao efeito rizosférico exercido pelas raízes de *R. mangle* que determinam a ocorrência de determinados grupos de micro-organismos os quais estão adaptados a utilizar os exsudatos das raízes como fonte de energia (COLARES; MELO, 2013).

Gomes *et al.* (2010) utilizaram sequenciamento em larga escala para acessar a diversidade bacteriana na rizosfera de plântulas transplantadas e de plantas nativas (não transplantadas) no mesmo habitat, também acessando a composição no sedimento sem vegetação. Os autores evidenciaram uma grande influência das raízes de mangue na abundância e composição de comunidades bacterianas na rizosfera. Cleary *et al.* (2012) também utilizaram o mesmo desenho experimental para validar o DGGE como abordagem para diferenciar a microbiota nas diferentes condições e em diferentes níveis hierárquicos.

Quanto a correlação da comunidade microbiana com os fatores ambientais medidos, foi observado que os teores de silte-argila foram os que explicaram a maior parte da variabilidade dos dados tanto para bactérias como para as arqueias. A textura do solo e mineralogia são relatados em vários estudos como importantes fatores na estruturação de comunidades

microbianas (SESSITSCH *et al.*, 2001; JACKSON; WEEKS, 2008; CARSON *et al.*, 2009, 2010). Como o solo é uma mistura de minerais e os micro-organismos do solo vivem aderidos a superfícies (CARSON *et al.*, 2009), a correlação com a estrutura do solo é algo esperado.

Entretanto, estudos em diversos ambientes apontam outros fatores como os principais na estruturação das comunidades microbianas em solos, como o hidrodinamismo, disponibilidade de nutrientes. O pH foi apontado por Fierer e Jackson (2006) como sendo o principal fator na estruturação de comunidades microbianas. Já nos estudos de Lozupone e Knight (2007) e Auguet *et al.* (2010) foi a salinidade que explicou parte da distribuição das comunidades microbianas. De fato, a salinidade no ano 5 foi estatisticamente significativa na estruturação as comunidades de bactérias. Este resultado foi diferente do encontrado por Nogueira (2011) e Rocha (2012) estudando os manguezais do Jaguaribe e do Cocó, respectivamente, também no estado do Ceará. Nos dois estudos foi feito o perfil de comunidades microbianas por DGGE e a correlação com os mesmos fatores ambientais medidos neste estudo. As autoras encontraram que no manguezal do Jaguaribe nenhuma das variáveis se correlacionou significativamente a estrutura das comunidades bacterianas, enquanto que no Cocó as comunidades bacterianas foram correlacionadas significativamente com todos os fatores, exceto com a salinidade.

Esses resultados só reforçam a ideia que os micro-organismos de solos estão expostos a inúmeras condições e que, no caso dos manguezais, elas são bastante variáveis e que é improvável que em um estudo se consiga determinar uma só variável responsável pela estruturação dessas comunidades. Monitoramentos de longo prazo são importantes ferramentas para se entender a dinâmica dos ambientes e de como as comunidades microbianas variam ao longo do tempo e em resposta a impactos.

1.5 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível observar uma grande variabilidade da estrutura de comunidades microbianas e uma dinâmica dos fatores ambientais medidos em sedimentos do manguezal do Pacoti ao longo de 5 anos. Uma parte da estrutura das comunidades pode estar relacionada com os conteúdos de silte-argila dos sedimentos, embora este fator não tenha atingido significância na maioria dos anos das análises. Outra parte dessa variabilidade acredita-se que pode ser explicada

pela influência da vegetação, pois a microbiota dos habitats dentro dos manguezais, mesmo estando sob influência de diferentes variáveis ambientais, ainda tem uma similaridade, provavelmente devido ao fato de que todas as amostras foram coletadas em zonas de raízes de *R. mangle*. Estudos como este reiteram a necessidade de se conhecer e de se monitorar a longo prazo os micro-organismos de sedimentos, pois estes são partes fundamentais para a conservação e resiliência desses ecossistemas.

CAPÍTULO 2 - Estrutura das comunidades de bactérias e arqueias em sedimentos de 5 manguezais do estado do Ceará

2.1 INTRODUÇÃO

É um fato conhecido que a diversidade e a composição das comunidades microbianas variam consideravelmente em escala espacial e esta variação é atribuída a fatores bióticos e abióticos (GREEN *et al.*, 2008; MARTINY *et al.*, 2006). Os estudos existentes sobre a biogeografia de comunidades microbianas em vários tipos de ambientes demonstram o grande interesse em se entender os padrões de distribuição exibidos por esses organismos. Comparar padrões de distribuição de micro-organismos com aqueles encontrados para animais e plantas é de extremo interesse para o desenvolvimento de teorias ecológicas. Mas talvez a mais importante razão de se estudar a biogeografia de micro-organismos é que os procariotos são seres diversos, ubíquos e abundantes em todos os tipos de ambientes e o principal, fundamentais para o funcionamento dos ecossistemas. Apesar disso, os padrões biogeográficos e os fatores que os governam ainda estão pobremente estudados (LAUBER *et al.*, 2009).

Os padrões biogeográficos exibidos pelos micro-organismos são variáveis e dependentes de um grande número de fatores, incluindo o grau de resolução filogenética da técnica utilizada (CHO; TIEDJE, 2000) e a escala espacial do estudo (NOGUEZ *et al.*, 2005). Entretanto alguns fatores comuns estão começando a ser encontrados em comunidades microbianas de solos (LAUBER *et al.*, 2009).

Micro-organismos de solo vivem em comunidades complexas e são responsáveis pela ciclagem de nutrientes e degradação de poluentes. Mudanças nas comunidades microbianas que resultam de práticas de agricultura, manejo dos ambientes e mudanças globais podem ter impactos profundos na dinâmica dos ecossistemas (MENDES *et al.*, 2014). Apesar do fato de que os ecossistemas são totalmente dependentes de micro-organismos, a estrutura da comunidade microbiana e a previsão de como a estrutura das comunidades microbianas responde aos impactos ambientais ou as ligações entre estrutura e processos dos ecossistemas têm sido difíceis de determinar (LAUBER *et al.*, 2009).

Os manguezais geralmente estão localizados em áreas urbanas e/ou turísticas, que vem sofrendo vários tipos de impactos antrópicos tais como poluição, erosão e desmatamento que comprovadamente alteram a diversidade e a composição das comunidades microbianas indígenas

e, conseqüentemente, afetam importantes funções que são responsáveis pela manutenção desses ambientes (ANDREOTE *et al.*, 2012).

Levando esse cenário em consideração, este estudo teve por objetivo acessar e comparar a estrutura das comunidades microbianas em áreas com ausência e presença de vegetação em cinco manguezais ao longo costa cearense (Pacoti, Ceará, Acaraú, Coreaú e Timonha), submetidos a diferentes tipos de impactos antrópicos. Além disso, objetivou-se correlacionar a estrutura da comunidade microbiana com as variáveis ambientais (pH, salinidade, matéria orgânica e silte-argila) em cada manguezal, entender os efeitos dos impactos na comunidade microbiana e procurar descrever os padrões de distribuição microbiana em sedimentos de manguezais.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Áreas de estudo

Os manguezais dos rios Pacoti, Ceará, Acaraú, Coreaú e Timonha, localizados na costa cearense, foram escolhidos de acordo com o tipo de impacto ao qual estavam submetidos a fim de avaliar a diversidade e a estrutura das comunidades microbianas que colonizam estes ambientes. O manguezal do rio Pacoti (PAC) é impactado pelo represamento do rio e urbanização, o manguezal do rio Ceará (CEA) sofre impactos derivados da intensa urbanização, os manguezais dos rios Acaraú (ACA) e Coreaú (COR) são afetados pela carcinicultura e o Timonha (TIM), representando um manguezal pristino, foi utilizado neste estudo como um controle (FIGURA 2.1). Alguns dados dos locais de amostragem estão apresentados na Tabela 2.1.

Figura 2.1 – Mapa da costa cearense com destaque para os municípios onde foram feitas as amostragens (CAMPOS *et al.*, 2003).



Tabela 2.1 – Algumas características das áreas de estudo e os principais impactos aos quais estão submetidos.

Manguezal	Coordenadas	Principais impactos	Área da Bacia ¹ (Km ²)	Área das fazendas de camarão			Cidade	População ³ (2010)
				2003 ¹ (ha)	Média de chuvas 2010 ² (mm)	Média de chuvas 2011 ² (mm)		
Pacoti (PAC)	3°49'06.25" S 38°24'31.56" W	Urbanização, açudagem	717	-	712	1.645	Aquiraz	72.651
Ceará (CEA)	3°42'04.87" S 38°36'05.42" W	Urbanização intensa	568	-	841	2.090	Fortaleza	2.447,409
Acaraú (ACA)	2°50'57.88" S 40°07'38.03" W	Carcinicultura	3000	743	572	1.476	Acaraú	57.542
Coreaú (COR)	2°53'34.85" S 40°49'52.67" W	Carcinicultura	4680	439	527	1.271	Camocim	60.163
Timonha (TIM)	2°56'49.34" S 41°19'05.15" W	Pristino	615	147	652	1.426	Barroquinha	14.475

¹ LACERDA *et al.*, 2008.² FUNCEME, 2013.³ IBGE, 2013.

2.2.2 Amostragem

Sedimentos da profundidade de até 10 cm foram coletados em quatro expedições, duas vezes por ano, em 2010 (ano 1) e 2011 (ano 2), de acordo com as estações seca e chuvosa que caracterizam a região semiárida do Brasil. Ambas as amostragens na estação chuvosa foram feitas no mês de maio, enquanto que, para a estação de seca, as amostragens foram em novembro, todas ocorrendo em maré baixa em uma distância variando de 1 a 2 km da foz do rio. Cinco réplicas de sedimento foram coletadas em três pontos distintos usando um amostrador cilíndrico de PVC (30 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro). O ponto 1 caracterizou-se por não possuir vegetação, enquanto os pontos 2 e 3 corresponderam a zonas de raízes de *Rhizophora mangle* e *Avicennia shaueriana*, respectivamente. As amostras de sedimento destinadas às análises moleculares foram armazenadas em frascos estéreis, colocados em gelo e mantidas refrigeradas para serem transportadas para o laboratório, onde foram armazenadas a -20 °C, enquanto os sedimentos utilizados para análises físico-químicas foram colocados em sacos plásticos e mantidos em temperatura ambiente.

2.2.3 Análise dos sedimentos

As medições de pH, salinidade e do conteúdo de matéria orgânica e silte-argila dos sedimentos foram feitas conforme descrito no item 1.2.2.

2.2.4 Extração de DNA, PCR – DGGE e Análise dos Dados

As extrações de DNA, PCRs, DGGEs e análise dos dados foram feitas conforme descrito nos itens 1.2.3, 1.2.4, 1.2.5, com exceção dos agrupamentos hierárquico derivados dos perfis de DGGE, os quais foram gerados usando o programa BioNumerics.

2.3 RESULTADOS

As variáveis ambientais acessadas em todas as expedições de amostragem estão apresentadas na Tabela 2.2. Os valores de pH variaram de 6,84 (PAC 1 S1) para 7,75 (CEA 1 S1) sem grandes mudanças entre manguezais, locais e estações de amostragem. A salinidade atingiu

valores mais elevados do que o mar, que é típico para os manguezais localizados na região Nordeste do Brasil, onde o clima semiárido, combinado com as altas taxas de evaporação e rios intermitentes, favorece o aumento da salinidade. Uma diminuição na salinidade na estação chuvosa, especialmente no segundo ano de amostragem (2011), quando o valor médio de precipitação foi mais elevado (TABELA 2.1), é notória em todos os manguezais, especialmente no ACA, devido a uma entrada maior de água doce. Quanto aos teores de matéria orgânica e silte-argila, COR apresentou os maiores valores, que podem ser atribuídos à área maior da bacia do rio Coreaú, que leva a uma maior descarga de água e acúmulo de matéria orgânica que, juntamente com as maiores porcentagens de silte-argila, contribuem para reter a matéria orgânica. Os menores valores de matéria orgânica foram encontrados no PAC, possivelmente devido a maiores taxas de deposição marinha causada pela diminuição na contribuição de água doce, devido à construção de barragens. A classificação do sedimento de acordo com o diagrama triangular mostrou sedimentos que variaram no espectro areia-lama, tendo o PAC mais amostras classificadas como areia (sedimento grosso) e o COR com mais lama (sedimento fino). Vale ressaltar também a prevalência de sedimentos mais grossos no ponto 1 (sem vegetação), pois as raízes são responsáveis por reterem sedimentos finos.

Tabela 2.2 – Variáveis ambientais e características dos sedimentos dos cinco manguezais estudados: Pacoti (PAC), Ceará (CEA), Acaraú (ACA), Coreaú (COR) e Timonha (TIM) nos três pontos de coleta (1-sedimento sem vegetação, 2- zona de raiz de *Rhizophora mangle* e 3- zona de raiz de *Avicennia shaueriana*) nas quatro amostragens (C1- estação chuvosa, ano 1; S1- estação seca, ano 1; C2- estação chuvosa, ano 2; e S2- estação seca, ano 2).

Amostra	Ponto	Estação	Ano	pH	Salinidade	Matéria Orgânica (g/Kg)	Silte-Argila (%)	Classe do sedimento
PAC 1 C1	1	Chuvosa	1	7,20	38	19,56	14,65	Areia
PAC 2 C1	2	Chuvosa	1	7,23	40	76,81	26,50	Areia lamosa
PAC 3 C1	3	Chuvosa	1	7,01	37	32,97	10,57	Areia
PAC 1 S1	1	Seca	1	6,84	45	30,44	17,86	Areia
PAC 2 S1	2	Seca	1	6,91	47	92,38	45,79	Areia lamosa
PAC 3 S1	3	Seca	1	7,31	49	85,92	66,88	Areia
PAC 1 C2	1	Chuvosa	2	7,29	35	11,80	10,88	Areia
PAC 2 C2	2	Chuvosa	2	7,27	40	56,16	22,40	Areia
PAC 3 C2	3	Chuvosa	2	7,30	32	33,65	13,96	Areia
PAC 1 S2	1	Seca	2	7,30	42	12,31	9,24	Areia
PAC 2 S2	2	Seca	2	7,23	40	34,91	19,31	Areia
PAC 3 S2	3	Seca	2	7,88	43	39,57	15,51	Areia

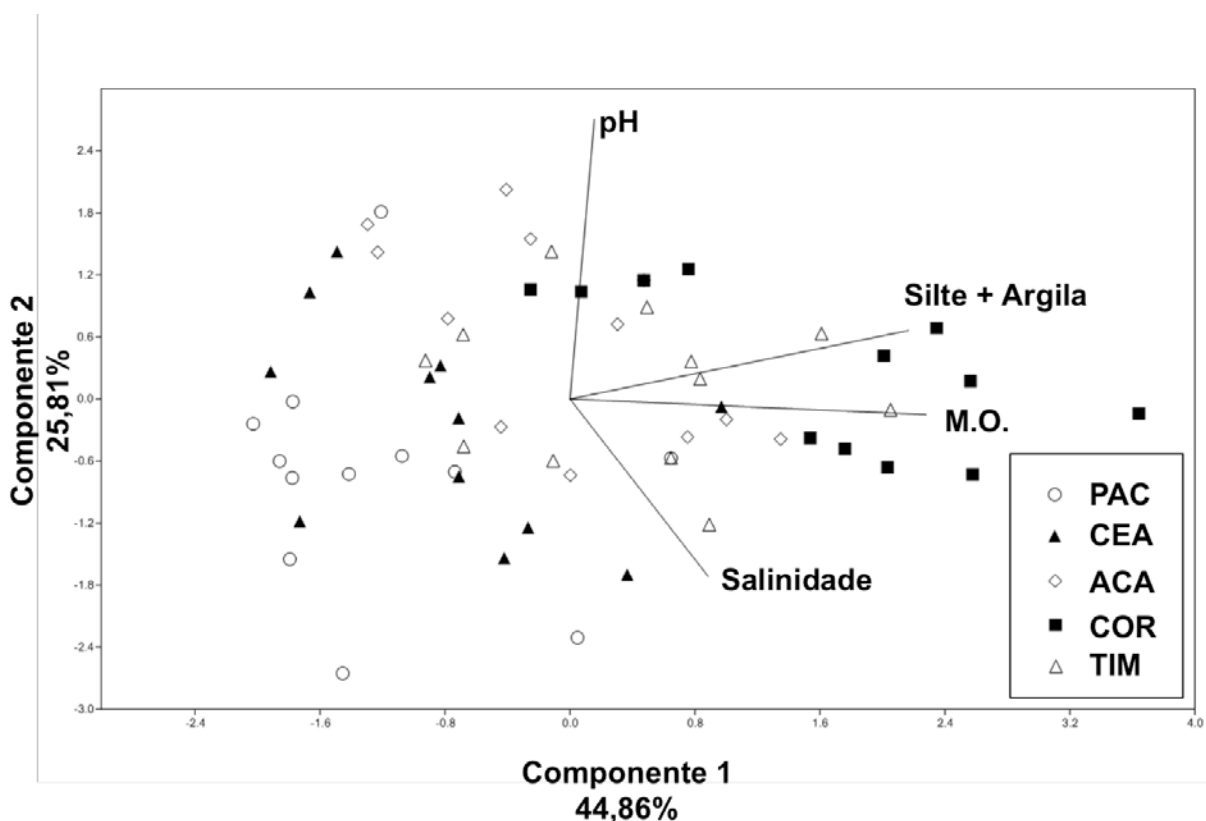
CEA 1 C1	1	Chuvosa	1	7,07	36	25,37	17,41	Areia
CEA 2 C1	2	Chuvosa	1	7,12	43	84,48	39,37	Areia lamosa
CEA 3 C1	3	Chuvosa	1	7,00	42	133,45	43,74	Areia lamosa
CEA 1 S1	1	Seca	1	7,75	40	29,52	13,74	Areia
CEA 2 S1	2	Seca	1	7,08	45	73,96	36,35	Areia lamosa
CEA 3 S1	3	Seca	1	7,34	40	63,72	32,74	Areia lamosa
CEA 1 C2	1	Chuvosa	2	7,38	33	18,84	13,45	Areia
CEA 2 C2	2	Chuvosa	2	7,36	35	53,19	35,96	Areia lamosa
CEA 3 C2	3	Chuvosa	2	7,40	35	69,85	30,29	Areia lamosa
CEA 1 S2	1	Seca	2	7,71	44	10,86	11,42	Areia
CEA 2 S2	2	Seca	2	7,36	35	53,19	35,96	Lama arenosa
CEA 3 S2	3	Seca	2	7,24	43	54,81	34,59	Areia lamosa
ACA 1 C1	1	Chuvosa	1	7,63	34	62,41	56,16	Lama arenosa
ACA 2 C1	2	Chuvosa	1	7,46	31	87,79	78,42	Lama
ACA 3 C1	3	Chuvosa	1	7,34	29	89,05	74,48	Lama arenosa
ACA 1 S1	1	Seca	1	7,32	42	54,09	46,25	Areia lamosa
ACA 2 S1	2	Seca	1	7,27	50	27,11	68,47	Lama
ACA 3 S1	3	Seca	1	7,37	52	105,19	81,93	Lama
ACA 1 C2	1	Chuvosa	2	7,30	7	43,79	57,52	Lama arenosa
ACA 2 C2	2	Chuvosa	2	7,33	5	86,04	75,11	Lama
ACA 3 C2	3	Chuvosa	2	7,29	10	55,83	50,92	Lama arenosa
ACA 1 S2	1	Seca	2	7,53	40	19,37	49,51	Areia Lamosa
ACA 2 S2	2	Seca	2	7,25	43	78,48	82,34	Lama
ACA 3 S2	3	Seca	2	7,27	42	90,40	87,63	Lama

COR 1 C1	1	Chuvosa	1	7,60	40	57,91	51,66	Lama arenosa
COR 2 C1	2	Chuvosa	1	7,46	31	87,79	78,42	Lama
COR 3 C1	3	Chuvosa	1	7,34	40	209,25	95,06	Lama
COR 1 S1	1	Seca	1	7,63	43	69,20	55,57	Lama arenosa
COR 2 S1	2	Seca	1	7,27	49	164,54	85,40	Lama
COR 3 S1	3	Seca	1	7,44	43	164,83	89,63	Lama
COR 1 C2	1	Chuvosa	2	7,50	31	120,45	73,79	Lama arenosa
COR 2 C2	2	Chuvosa	2	7,12	35	168,76	90,06	Lama
COR 3 C2	3	Chuvosa	2	7,15	35	157,63	86,17	Lama
COR 1 S2	1	Seca	2	7,53	43	219,13	74,53	Lama arenosa
COR 2 S2	2	Seca	2	7,39	48	284,56	92,50	Lama
COR 3 S2	3	Seca	2	7,44	43	164,83	89,63	Lama
TIM 1 C1	1	Chuvosa	1	7,18	38	78,38	54,06	Lama arenosa
TIM 2 C1	2	Chuvosa	1	7,01	40	98,69	84,07	Lama
TIM 3 C1	3	Chuvosa	1	7,53	40	82,22	70,76	Lama arenosa
TIM 1 S1	1	Seca	1	7,26	40	52,83	40,11	Areia lamosa
TIM 2 S1	2	Seca	1	7,44	46	91,22	74,13	Lama arenosa
TIM 3 S1	3	Seca	1	7,31	49	85,92	66,88	Lama arenosa
TIM 1 C2	1	Chuvosa	2	7,28	25	45,72	60,66	Areia lamosa
TIM 2 C2	2	Chuvosa	2	7,26	26	52,37	46,70	Lama arenosa
TIM 3 C2	3	Chuvosa	2	7,52	30	54,59	71,09	Areia lamosa
TIM 1 S2	1	Seca	2	7,49	43	135,80	87,01	Lama arenosa
TIM 2 S2	2	Seca	2	7,41	48	185,18	75,99	Lama
TIM 3 S2	3	Seca	2	7,45	44	87,18	75,99	Lama

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para visualizar a variabilidade dos dados ambientais, revelando os principais fatores responsáveis por explicar mais de 70% da variabilidade total dentro do conjunto de dados (FIGURA 2.2). O componente 1, que explicou quase 45% da variabilidade total, foi positivamente correlacionado com os conteúdos de matéria orgânica e silte-argila, mostrando uma forte relação entre esses dois fatores. As amostras de COR, que apresentaram os maiores valores dessas duas variáveis, se correlacionaram

positivamente com este eixo, enquanto as amostras de CEA e PAC, que apresentaram os menores valores, correlacionaram-se negativamente com este eixo. O Componente 2, que explicou mais de 26% da variabilidade total, foi positivamente correlacionado com pH e negativamente com a salinidade, o que explica a distribuição das amostras de ACA do ano da estação chuvosa 2, negativamente correlacionadas com este eixo, devido à diminuição da salinidade nestas amostras. No geral, é possível constatar três grupos na PCA, um grupo formado por COR, outro pelas amostras de TIM e ACA e outra pelo PAC e CEA com valores altos, intermediários e baixos de matéria orgânica e silte-argila, respectivamente.

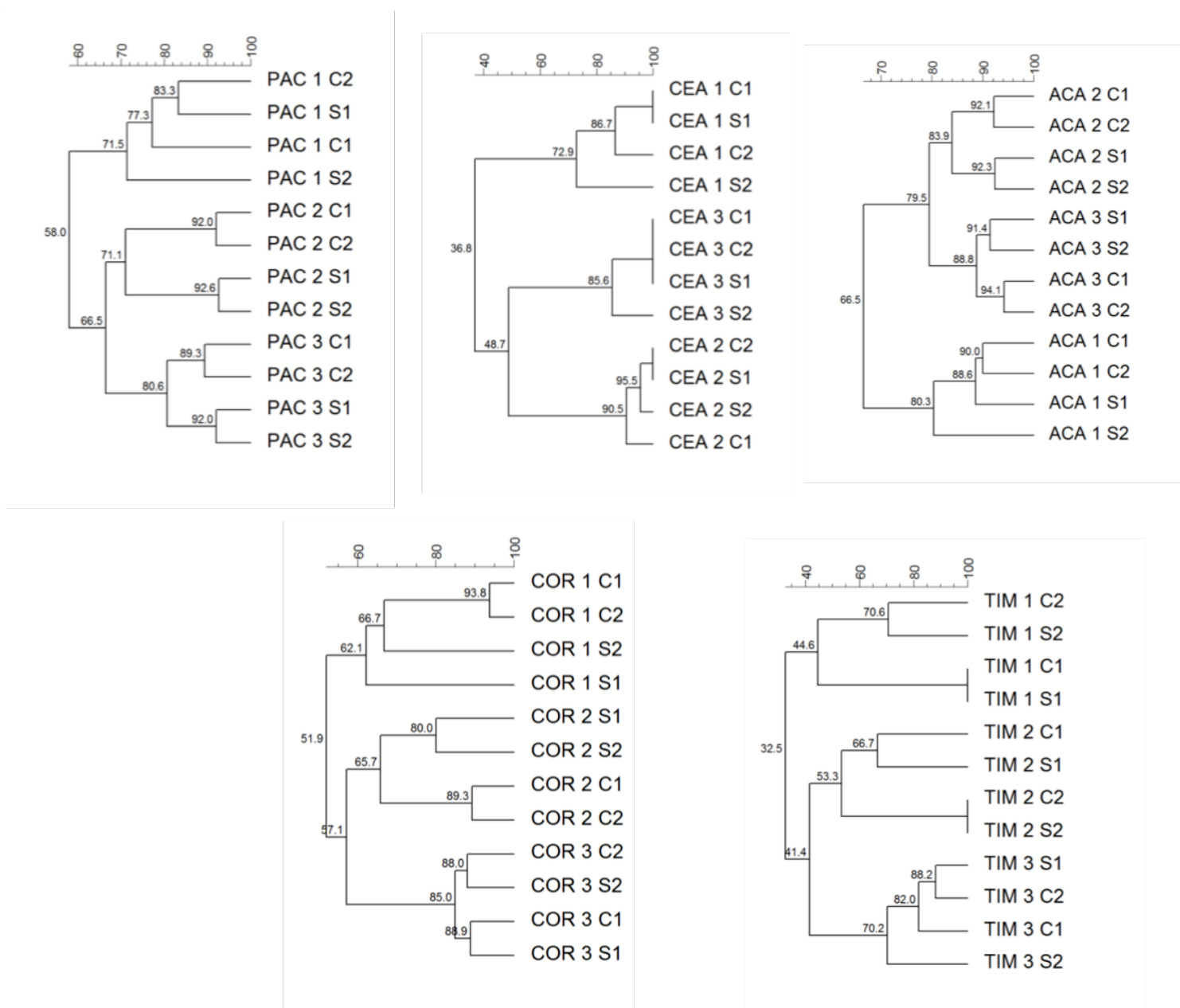
Figura 2.2 – Ordenação das variáveis ambientais em função da Análise de Componentes Principais (PCA) para sedimentos de cinco manguezais do Ceará: Pacoti (PAC), Ceará (CEA), Acaraú (ACA), Coreau (COR) e Timonha (TIM).



Analisando os agrupamentos derivados dos perfis de DGGE para as comunidades bacterianas (FIGURA 2.3), nota-se que os pontos de coletas nas zonas de raízes (pontos 2 e 3) tiveram uma maior similaridade em todos os manguezais analisados em relação ao ponto sem

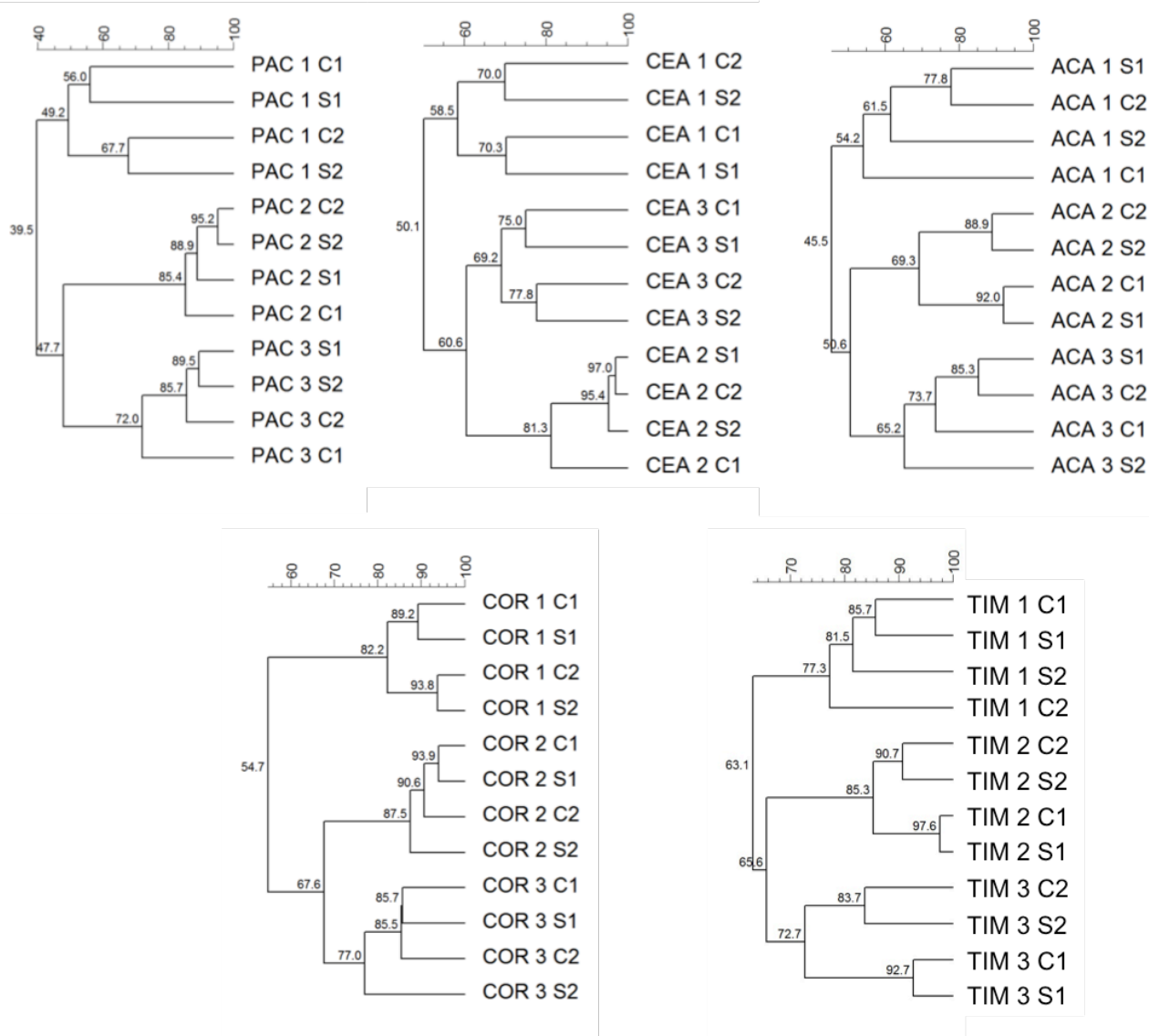
vegetação (ponto 1), que ficou agrupado separadamente. Quanto aos períodos de coleta, houve uma tendência de agrupamento sazonal.

Figura 2.3 – Agrupamentos de manguezais em função das estruturas de comunidades de bactérias obtidas a partir dos perfis de DGGE utilizando o algoritmo UPGMA e a distância de Jaccard. Pacoti (PAC), Ceará (CEA), Acaraú (ACA), Coreau (COR) e Timonha (TIM). Foram incluídas na análise as amostras dos 3 pontos de coleta e das duas estações (seca, anos 1 e 2; S1 e S2) e (chuvosa, anos 1 e 2; C1 e C2).



Ao analisar os grupos formados pelas matrizes de presença/ausência derivados do DGGE para o domínio Archaea observou-se que o sedimento sem vegetação (ponto 1) agrupou separadamente das zonas de raiz (pontos 2 e 3) em todos os manguezais, indicando que as raízes também exercem um efeito sobre a estrutura das comunidades de arqueias (FIGURA 2.4). A tendência de um agrupamento anual ao invés de sazonal das comunidades de arqueias foi evidenciada em todos os manguezais.

Figura 2.4 – Agrupamentos de manguezais em função das estruturas de comunidades de arqueias obtidas a partir dos perfis de DGGE utilizando o algoritmo UPGMA e a distância de Jaccard. Pacoti (PAC), Ceará (CEA), Acaraú (ACA), Coreau (COR) e Timonha (TIM). Foram incluídas na análise as amostras dos 3 pontos de coleta e das duas estações (seca, anos 1 e 2; S1 e S2) e (chuvosa, anos 1 e 2; C1 e C2).



A riqueza de ribotipos, ou seja o número de bandas no gel do DGGE, (TABELAS 2.3 e 2.4) também foi diferente para as comunidades de bactérias e arqueias. Os manguezais impactados ACA, PAC, COR e CEA apresentaram as maiores riquezas de bactérias, enquanto TIM (manguezal pristino) apresentou a menor riqueza. Já para as comunidades de arqueias, a

riqueza decresceu na seguinte ordem: TIM; COR; CEA; ACA e PAC. Ao analisar a riqueza de ribotipos por ponto de amostragem, foi possível encontrar uma menor riqueza de bactérias na área sem vegetação, principalmente nos manguezais impactados pela carcinicultura. Já analisando em termos de estação de coleta, não foi evidenciada diferença entre os períodos chuvoso e seco.

Tabela 2.3 – Riqueza de ribotipos de Bacteria baseada na análise das matrizes de presença e ausência derivadas de análises de géis de DGGE.

Amostra	Riqueza	Amostra	Riqueza	Amostra	Riqueza	Amostra	Riqueza	Amostra	Riqueza
PAC 1 C1	23	CEA 1 C1	13	ACA 1 C1	29	COR 1 C1	15	TIM 1 C1	11
PAC 2 C1	24	CEA 2 C1	19	ACA 2 C1	38	COR 2 C1	25	TIM 2 C1	18
PAC 3 C1	27	CEA 3 C1	17	ACA 3 C1	33	COR 3 C1	24	TIM 3 C1	14
PAC 1 S1	27	CEA 1 S1	13	ACA 1 S1	29	COR 1 S1	18	TIM 1 S1	11
PAC 2 S1	25	CEA 2 S1	21	ACA 2 S1	37	COR 2 S1	31	TIM 2 S1	12
PAC 3 S1	24	CEA 3 S1	17	ACA 3 S1	34	COR 3 S1	27	TIM 3 S1	16
PAC 1 C2	28	CEA 1 C2	15	ACA 1 C2	28	COR 1 C2	16	TIM 1 C2	16
PAC 2 C2	24	CEA 2 C2	21	ACA 2 C2	35	COR 2 C2	28	TIM 2 C2	14
PAC 3 C2	26	CEA 3 C2	17	ACA 3 C2	33	COR 3 C2	23	TIM 3 C2	16
PAC 1 S2	26	CEA 1 S2	18	ACA 1 S2	29	COR 1 S2	17	TIM 1 S2	13
PAC 2 S2	27	CEA 2 S2	21	ACA 2 S2	38	COR 2 S2	32	TIM 2 S2	14
PAC 3 S2	24	CEA 3 S2	17	ACA 3 S2	33	COR 3 S2	24	TIM 3 S2	13
Média	25,4		17,4		33		23,3		14

Tabela 2.4 – Riqueza de ribotipos de Archaea baseada na análise das matrizes de presença e ausência derivadas de análises de géis de DGGE.

Amostra	Riqueza	Amostra	Riqueza	Amostra	Riqueza	Amostra	Riqueza	Amostra	Riqueza
PAC 1 C1	18	CEA 1 C1	27	ACA 1 C1	25	COR 1 C1	36	TIM 1 C1	33
PAC 2 C1	21	CEA 2 C1	27	ACA 2 C1	25	COR 2 C1	32	TIM 2 C1	41
PAC 3 C1	18	CEA 3 C1	32	ACA 3 C1	32	COR 3 C1	25	TIM 3 C1	43
PAC 1 S1	21	CEA 1 S1	24	ACA 1 S1	23	COR 1 S1	34	TIM 1 S1	32
PAC 2 S1	20	CEA 2 S1	29	ACA 2 S1	26	COR 2 S1	32	TIM 2 S1	41
PAC 3 S1	18	CEA 3 S1	33	ACA 3 S1	31	COR 3 S1	27	TIM 3 S1	40
PAC 1 C2	26	CEA 1 C2	32	ACA 1 C2	22	COR 1 C2	31	TIM 1 C2	31
PAC 2 C2	22	CEA 2 C2	24	ACA 2 C2	23	COR 2 C2	32	TIM 2 C2	41
PAC 3 C2	21	CEA 3 C2	31	ACA 3 C2	31	COR 3 C2	25	TIM 3 C2	40
PAC 1 S2	26	CEA 1 S2	31	ACA 1 S2	26	COR 1 S2	31	TIM 1 S2	33
PAC 2 S2	21	CEA 2 S2	24	ACA 2 S2	25	COR 2 S2	29	TIM 2 S2	40
PAC 3 S2	24	CEA 3 S2	29	ACA 3 S2	28	COR 3 S2	25	TIM 3 S2	39
Média	21,3		28,5		26,4		29,9		37,8

A Análise de Redundância (RDA) foi utilizada para ajudar a revelar os principais descritores da estrutura da comunidade microbiana em sedimentos de manguezais. Efeitos marginais e condicionais foram analisados. O primeiro reflete o percentual de variância (LambdaA) explicado por apenas uma variável, enquanto as outras são omitidas. O último refere-se ao percentual de variância (Lambda1) que foi explicado por uma variável quando as outras também são consideradas no modelo. As Tabelas 2.5 e 2.6 mostram a variância explicada por cada fator e os valores de p.

Observando os valores obtidos para as comunidades de Bacteria, o conteúdo de silte-argila explicou 35% da variância no manguezal do rio Ceará e 16% no manguezal do rio Coreaú. Essa variável influenciou significativamente a estrutura das comunidades bacterianas nestes dois manguezais, enquanto nos demais manguezais nenhuma das variáveis atingiram significância.

Para as arqueias, a matéria orgânica explicou 16% da variância total no PAC e esta variável mostrou-se importante para a estrutura dessa comunidade, embora não tenha atingido significância ($p = 0,06$). Porcentagens de silte-argila explicaram 20, 16 e 20% da variação em CEA, ACA e COR, respectivamente. Essa variável também foi a única que influenciou a estrutura da comunidade de arqueia no CEA, COR e ACA de forma significativa ($p < 0,05$), enquanto que em PAC e TIM nenhuma das variáveis atingiram valores significativos.

Tabela 2.5 – Efeitos de variáveis ambientais sobre a comunidade de Bacteria em sedimentos de manguezais explicados por Análise de Redundância (RDA).

			pH	Salinidade	Matéria Orgânica	Silte-Argila
Pacoti (PAC)	Efeito marginal	Lambda1	0,13	0,04	0,12	0,09
	Efeito condicional	LambdaA	0,13	0,08	0,12	0,09
		p	0,078	0,438	0,162	0,442
Ceará (CEA)	Efeito marginal	Lambda1	0,09	0,07	0,27	0,35
	Efeito condicional	LambdaA	0,07	0,02	0,03	0,35
		p	0,348	0,86	0,842	0,004*
Acaraú (ACA)	Efeito marginal	Lambda1	0,06	0,05	0,13	0,09
	Efeito condicional	LambdaA	0,05	0,05	0,13	0,08
		p	0,932	0,892	0,088	0,522
Coreaú (COR)	Efeito marginal	Lambda1	0,15	0,07	0,1	0,16
	Efeito condicional	LambdaA	0,06	0,09	0,09	0,16
		p	0,772	0,388	0,412	0,014*
Timonha (TIM)	Efeito marginal	Lambda1	0,06	0,06	0,05	0,09
	Efeito condicional	LambdaA	0,06	0,13	0,13	0,09
		p	0,7	0,146	0,108	0,41

*Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

Tabela 2.6 – Efeitos de variáveis ambientais sobre a comunidade de Archaea em sedimentos de manguezais explicados por Análise de Redundância (RDA).

			pH	Salinidade	Matéria Orgânica	Silte-Argila
Pacoti (PAC)	Efeito marginal	Lambda1	0,110	0,040	0,160	0,060
	Efeito condicional	LambdaA P	0,100 0,266	0,050 0,760	0,160 0,060	0,090 0,410
Ceará (CEA)	Efeito marginal	Lambda1	0,090	0,080	0,160	0,200
	Efeito condicional	LambdaA P	0,050 0,858	0,050 0,908	0,090 0,358	0,200 0,002*
Acaraú (ACA)	Efeito marginal	Lambda1	0,110	0,050	0,110	0,160
	Efeito condicional	LambdaA P	0,090 0,410	0,040 0,902	0,080 0,544	0,160 0,016*
Coreaú (COR)	Efeito marginal	Lambda1	0,180	0,060	0,100	0,200
	Efeito condicional	LambdaA P	0,080 0,342	0,070 0,692	0,080 0,470	0,200 0,014*
Timonha (TIM)	Efeito marginal	Lambda1	0,090	0,090	0,010	0,080
	Efeito Condicional	LambdaA P	0,100 0,396	0,090 0,446	0,010 0,268	0,070 0,656

*Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

2.4 DISCUSSÃO

As propriedades intrínsecas do solo os transformam em habitats perfeitos para os micro-organismos, que são responsáveis pela ciclagem de nutrientes e equilíbrio desses ecossistemas. Assim, não é surpreendente que os solos sejam considerados os mais diversos ambientes da Terra, contendo milhões de micro-organismos por grama. É bem conhecido que impactos ambientais alteram a qualidade da água, a entrada de água doce e salgada, o regime de sedimentação e, como resultado, a composição dos sedimentos em ambientes costeiros. Já que os solos/sedimentos demonstram grande heterogeneidade espacial em suas propriedades físicas e químicas, os micro-organismos que colonizam os microhabitats resultantes dessa heterogeneidade devem ser influenciados pelo tipo de solo/sedimento e a sua qualidade.

Comunidades microbianas em sedimentos de manguezais submetidos a diferentes tipos de impactos ao longo da costa do Estado do Ceará foram analisadas por DGGE neste trabalho. Esta técnica independente de cultivo é acessível e rápida, além de ser capaz de detectar os principais grupos de micro-organismos e mudanças nas comunidades microbianas em vários tipos de ambientes.

As análises de DGGE foram capazes de detectar uma menor riqueza de ribotipos de Bacteria no manguezal pristino (TIM) do que nos manguezais impactados. Gomes *et al.* (2008) encontraram resultado semelhante estudando por DGGE comunidades bacterianas em sedimentos de manguezais contaminados com hidrocarbonetos. Os autores viram um aumento na diversidade nos pontos contaminados em relação aos pontos não contaminados. Esse aumento na diversidade foi atribuído ao fato de que espécies diferentes podem desempenhar funções similares, então a alta diversidade observada nesses sedimentos pode conferir estabilidade ao ecossistema frente a distúrbios no ambiente.

O inverso foi observado para o domínio Archaea, ou seja, as análises de DGGE detectaram um aumento na riqueza de ribotipos no manguezal pristino (TIM), quando comparado com os manguezais impactados.

No manguezal do rio Pacoti (PAC), que acumula os efeitos negativos da intensa urbanização do seu entorno, as alterações no regime sedimentar, levaram à acumulação de sedimentos arenosos, que apresentam menor capacidade de retenção de matéria orgânica. Portanto, não surpreendentemente as comunidades de arqueias neste manguezal foram mais

influenciadas pelos teores de matéria orgânica, de acordo com os resultados de RDA, enquanto nos outros manguezais estudados a estrutura das comunidades de arqueias foi significativamente influenciada pelas percentagens de silte-argila. Este fato pode explicar a menor riqueza de arqueias encontrada no manguezal do Pacoti, pois as arqueias interagem e fazem uso do ambiente de forma mais restritiva 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 (WALSH; PAPKE; DOOLITTLE, 2005). Como o sedimento apresentou-se menos agregado, este provavelmente não tenha proporcionado os micronichos para as arqueias se estabelecerem. A maneira mais restritiva de colonizar os ambientes exibida pelas arqueias pode explicar o padrão anual de agrupamento ao invés de sazonal, encontrado para as bactérias, portanto as arqueias parecem ser menos suscetíveis às flutuações impostas pela sazonalidade, enquanto as bactérias são mais dinâmicas, alterando sua estrutura de acordo com a estação.

Este é o primeiro estudo que caracteriza as comunidades microbianas em sedimentos de manguezais impactados pela carcinicultura. Estima-se que 97% da produção de camarão no Brasil estejam concentrados na região nordeste e o desenvolvimento desta atividade tem sido acompanhado de uma grande preocupação, devido à descarga de efluentes ricos em nitrogênio e fósforo nas zonas costeiras, o que pode ocasionar a proliferação de espécies patogênicas exóticas, que causam doenças e desequilíbrio desses ecossistemas. Estudando as comunidades bacterianas totais e de *Vibrio* spp. em efluentes de fazenda de camarão na mesma região deste estudo, utilizando DGGE, Sousa *et al.* (2006) não detectaram mudanças associadas com fazendas de camarão ou qualquer diminuição da diversidade genética. Torsvik *et al* (1998), no entanto, estimaram uma perda de 250 vezes a diversidade original de manguezais após a conversão e abandono de criadouros de peixes.

Da mesma forma, neste trabalho foi detectada uma redução de ribotipos de arqueias nos manguezais impactados pela carcinicultura, especialmente em ACA, onde a área da fazenda é maior. Já com as bactérias o comportamento foi inverso, tendo o manguezal do rio Acaraú sido o que apresentou a maior riqueza de bactérias. Essa inversão nos padrões de bactérias e arqueias pode ser explicada pela atuação diferencial desses dois grupos em condições de disponibilidade de nutrientes. Arqueias e bactérias oxidadoras de amônia (AOA e AOB, respectivamente), por exemplo, atuam diferencialmente sob diferentes concentrações de nitrogênio no ambiente, de tal

forma que as AOB são favorecidas pela alta disponibilidade de nutrientes no solo, enquanto as AOA preferem ambientes oligotróficos, ocupando, assim, diferentes nichos (JARRELL *et al.*, 2011), como em ambientes impactados pela carcinicultura há geralmente uma alta disponibilidade de nitrogênio (SOUSA, *et al.* 2006), este fato pode explicar a maior riqueza de bactérias e uma menor de arqueias em ACA.

Sedimentos do manguezal do rio Ceará (CEA) mostraram um acúmulo dos minerais Al, Cu, Cr e Zn, sendo considerados de moderada a fortemente contaminados e estudos atribuem esta contaminação para o tráfego de navios e da marina que estão presentes na região (NILIN *et al.*, 2013). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em concentrações moderadas a elevadas também foram encontradas neste manguezal (CAVALCANTE *et al.*, 2009). No estudo realizado por Ribeiro *et al.* (2013) usando ARDRA para caracterizar as arqueias em sedimentos de manguezais com diferentes níveis de contaminação, as influências antrópicas na Baía de Paranaguá, sudeste do Brasil, mostrou-se não ser suficiente para produzir alterações nos grupos dominantes de procariotos. Em contraste, Sandaa; Enger; Torsvik (1999) estudando a abundância e diversidade de Archaea em solos contaminados por metais pesados, mostraram uma redução significativa no percentual de arqueias, bem como diferenças qualitativas na estrutura da comunidade em comparação ao solo não contaminado. Embora neste estudo as propriedades químicas dos sedimentos não foram medidas, algumas propriedades físicas foram analisadas e foram descritas as características das áreas estudadas e foi perceptível uma diminuição na riqueza tanto de bactérias como de arqueias nos sedimentos do manguezal do rio Ceará quando comparada com os outros manguezais estudados.

Neste trabalho, os percentuais de silte-argila tiveram uma influência significativa sobre a distribuição tanto das comunidades de bactérias como de arqueias em alguns dos manguezais estudados, este resultado contrasta com Fierer e Jackson (2006) que fizeram um estudo de biogeografia microbiana, no qual eles constataram que o pH foi o fator mais importante na distribuição microbiana. Em outros estudos de biogeografia como os de Lozupone e Knight (2007) e Auguet *et al.* (2010) a salinidade explicou uma parte significativa dos padrões de distribuição.

A textura do solo e mineralogia são relatados em vários estudos como fatores determinantes na estrutura das comunidades microbianas em todos os tipos de ambientes (SESSITSCH *et al.*, 2001; JACKSON; WEEKS, 2008; CARSON *et al.*, 2009, 2010), já que o

solo é uma mistura de minerais e os micro-organismos vivem ligados a superfícies (CARSON *et al.*, 2009).

Por exemplo, em antrosolos amazônicos, Taketani; Tsai (2010) estudaram a influência dos diferentes usos da terra na estrutura das comunidades de Archaea e nos genes *AmoA*. A análise de correspondência canônica derivada dos perfis gerados por T-RFLP mostrou que a estrutura da comunidade de arqueias foi principalmente influenciada por atributos do solo que diferenciam as antrosolos (Terra Preta) do solo adjacente (ou seja pH, enxofre e matéria orgânica). Os autores descobriram que a estrutura geral da comunidade de arqueia nesses solos é determinada pelo tipo de solo e também pelo uso da terra.

Além disso, em um estudo realizado em solos chineses, a distribuição e diversidade das comunidades de arqueia foi investigada e a análise de correspondência canônica indicou que a comunidade foi influenciada principalmente pelo pH do solo, embora os resultados também indicaram que a abundância de arqueias variou significativamente nos diferentes tipos de solo. Crenarchaeota foi o principal filo de arqueia nesses solos chineses, embora também foram observados algumas arqueias preferindo habitats específicos, o que os autores atribuíram ao conceito de particionamento de nicho de grupos de arqueias terrestres (CAO *et al.*, 2012).

Mendes *et al.* (2012) também estudaram, no sudeste do Brasil, assembleias de arqueias em áreas pristinas e urbanas, mas em diferentes estratos (0-10, 10-20, 20-30 e 30-40 cm), utilizando T-RFLP e bibliotecas de clones e encontraram diferenças na estrutura das comunidades de arqueia relacionadas à localização, profundidade e atributos do solo de acordo com a análise de redundância (RDA) dos perfis de T-RFLP. Variáveis como pH, matéria orgânica, potássio e magnésio apresentaram correlação significativa com a estrutura da comunidade em geral. O sequenciamento mostrou uma mudança na composição de arqueia de acordo com a profundidade de amostragem em vez da localização, ou seja, a composição de arqueias na mesma profundidade em diferentes manguezais era mais similar do que no mesmo manguezal em diferentes profundidades, mostrando que este também é um importante fator na composição de arqueias.

Um trabalho anterior do nosso grupo estudou a estrutura das comunidades microbianas no manguezal do rio Pacoti na zona de raiz de *Rhizophora mangle* em três habitats distintos dentro do manguezal utilizando DGGE e encontrou, à semelhança de Mendes *et al.* (2012), usando análises de redundância, que variáveis, tais como a matéria orgânica e as porcentagens de silte-

argila apresentaram correlação significativa com a estrutura da comunidade em geral. Ainda comparando os resultados do presente trabalho e do estudo anterior, começa-se a encontrar padrões, como o agrupamento anual, em vez de sazonal, para arqueias, confirmou-se o efeito exercido pelas raízes nas comunidades microbianas e as percentagens de silte-argila como principais fatores estruturantes das comunidades microbianas. Estes resultados são importantes na definição de padrões de ocorrência das comunidades microbianas e prevenção de respostas a impactos.

Neste trabalho também foi observado tanto para as comunidades de arqueia quanto de bactéria que as amostras sem vegetação e de zonas de raízes agruparam-se separadamente, resultado que pode ser atribuído ao efeito rizosférico, um fenômeno bem caracterizado em plantas tipicamente terrestres, porém em mangues foi apenas recentemente descrito por Gomes *et al.* em 2010. Os autores especulam que, em ambientes de condições flutuantes como os manguezais, as plantas podem não impor uma pressão seletiva semelhante às plantas exclusivamente terrestres nas comunidades microbianas. Entretanto, os autores afirmam que as raízes de mangues são habitats para bactérias específicas e, assim, os mangues também exerceriam o efeito rizosférico. Confirmando esses resultados, Peixoto *et al.* (2011), por meio da análise de comunidades bacterianas de sedimentos sem vegetação e de rizosfera de mangue por DGGE, também constataram que os habitats analisados tinham uma distribuição claramente diferente, estando geralmente em grupos distintos.

Para arqueias, Pires *et al.* (2012) investigaram sua diversidade utilizando DGGE e pirosequenciamento em solos sem vegetação e rizosfera de duas espécies de mangue, *R. mangle* e *Laguncularia racemosa* e encontraram que a riqueza de arqueias foi maior na rizosfera de *L. racemosa*, intermediária em sedimentos sem vegetação, e menor na rizosfera de *R. mangle*. Ambos os microhabitats de rizosferas tiveram a mesma distribuição de classes de arqueias, mas com diferentes abundâncias relativas. Por outro lado, a distribuição de classes do sedimento sem vegetação foi diferente em relação às amostras da rizosfera. Este trabalho também mostrou uma composição da comunidade diferente em zonas de raiz, quando comparado com o sedimento sem vegetação. No entanto, não se pode evidenciar um padrão de riqueza em sedimentos sem vegetação ou nas zonas de raiz, pois os valores de riqueza encontrados foram muito variáveis ao longo dos manguezais e as estações estudadas.

Em sedimentos de um estuário tropical na costa centro-oeste da Índia, Singh *et al.* (2010) descobriram que a diversidade filogenética de RNAr 16S de arqueias e genes de amônia mono-oxigenase são influenciados pela vegetação de manguezal junto aos trechos mais baixos nos dois estuários estudados. Li *et al.* (2011) encontraram também que a distribuição espacial das arqueias oxidantes de amônia apresentaram maior nos sedimentos da camada de superfície perto das árvores de mangue (0 e 10 m), mas menor diversidade e abundância em maiores distâncias das árvores de mangue (1.000 m). Pires *et al.* (2012) também detectaram a arqueia oxidante de amônia (AOA), *Nitrosopumilus* sp., em forte associação com raízes de *R. mangle* e isso sugere seu envolvimento na nitrificação na rizosfera. Estes resultados reforçam o fato de que vários grupos de arqueias com papéis possivelmente importantes na ciclagem de nutrientes em sedimentos tenham fortes associações com as rizosferas de espécies de mangues. Na verdade, as plantas de manguezal e micro-organismos têm um relacionamento íntimo, no qual as comunidades microbianas reciclam nutrientes importantes para as plantas, como nitrogênio e fósforo, e a comunidade microbiana associada às raízes de árvores de mangue parece ser específica para cada espécie de planta sendo determinada pela composição dos exsudatos de raízes.

2.5 CONCLUSÃO

As comunidades microbianas nos cinco manguezais estudados parecem estar sofrendo modificações e estas estão tendo reflexo na riqueza microbiana dos sedimentos. A presença e o tipo da vegetação de mangue também parece exercer uma grande influência na estruturação das assembleias microbianas. Apesar das diferenças e da grande distância entre os manguezais estudados, foi possível encontrar padrões temporais e espaciais correlacionados às condições ambientais, principalmente com os conteúdos de silte-argila dos sedimentos. Esses achados constituem um ponto de partida para a obtenção de uma maior caracterização destes ambientes. Esse conhecimento é fundamental para planejar ações de conservação e/ou restauração desses ecossistemas tão ameaçados.

CAPÍTULO 3 – Estudo da diversidade procariótica de sedimentos de 5 manguezais por meio de sequenciamento em larga escala

3.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento recente das técnicas de sequenciamento de nova geração ou de larga escala permitiu analisar simultaneamente um número relativamente alto de amostras individuais possibilitando pesquisar as comunidades microbianas com uma robustez a qual seria difícil ou demasiadamente cara usando clonagem e sequenciamento de Sanger. Com a aplicação destas tecnologias, tornou-se evidente que a diversidade das comunidades microbianas que habitam a biosfera são muito mais elevadas do que as estimativas anteriores, com base em métodos tradicionais de cultivo e/ou técnicas independentes de cultivo de baixa resolução (LAUBER *et al.*, 2009).

O sequenciamento de nova geração pode gerar grande quantidade de dados em um curto período de tempo com custos cada vez menores. Os dados obtidos mostram a clara complexidade das comunidades microbianas em ambientes naturais, porém o sequenciamento tem como resultado fragmentos parciais de genomas e algumas vezes de baixa qualidade, impondo um grande desafio para se remover no computador (*in silico*) os artefatos, anotar e analisar todos os dados que são gerados por esses métodos (HERNANDEZ *et al.*, 2008).

Embora existam ferramentas de bioinformática para juntar as sequências, assinalar a taxonomia e ferramentas para análises de diversidade e estatística, estas ainda são escassas e possuem limitações. Uma dessas ferramentas de bioinformática trata-se do programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) ou “percepções quantitativas em ecologia microbiana” um software livre que foi desenvolvido para resolver o problema de análise de dados de sequenciamento (CAPORASO *et al.*, 2010a).

Este capítulo teve como objetivo fornecer uma descrição da diversidade microbiana em sedimentos dos manguezais Pacoti, Ceará, Acaraú, Coreaú e Timonha, situados ao longo da costa cearense, os quais estão submetidos a variados tipos de impactos, considerando também as flutuações impostas pelos regimes sazonais das estações seca e chuvosa que caracterizam o clima com influência do semiárido nordestino e a ausência e presença de diferentes espécies de mangues.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Áreas de estudo

A costa do nordeste é uma das mais dinâmicas do Brasil. O clima semiárido favorece a ocorrência de rios intermitentes, no qual a entrada de água doce é limitada, levando a um aumento na descarga de água doce na estação chuvosa, geralmente no primeiro semestre do ano, com o oposto ocorrendo no segundo semestre durante a estação seca. O alto número de barramentos nos rios, a ocupação extensiva da costa provocada pelo turismo, a urbanização e o estabelecimento de fazendas de camarão tem alterado significativamente as condições ambientais nesta porção da costa brasileira. Deste modo, 5 manguezais do estado do Ceará (Pacoti, Ceará, Acaraú, Coreaú e Timonha) foram escolhidos de acordo com o impacto ao qual estão submetidos. O mapa e informações das áreas de coleta estão apresentados no item 2.2.1.

3.2.2 Amostragem

A coleta dos sedimentos foi realizada conforme descrito no item 2.2.2.

3.2.3 Extração de DNA e sequenciamento

Ao todo foram coletadas 300 amostras de sedimentos (5 manguezais, 3 pontos de coleta, 4 expedições e 5 replicatas). O DNA genômico de todas as amostras, individualmente, foi extraído usando o kit comercial *PowerSoil-htp 96 Well Soil DNA Isolation* (MO BIO, EUA), de acordo com o manual do fabricante, com a adição de uma incubação de 10 minutos a 65 °C, seguindo a padronização recomendada pelo *Earth Microbiome Project* (<http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/dna-extraction-protocol/>) (GILBERT *et al.*, 2010). Devido ao grande número de amostras, a extração de DNA foi feita utilizando-se o sistema automatizado epMotion 5075 (Eppendorf) do *Lawrence Berkeley National Laboratory* (Berkeley, EUA).

Para a análise do gene do RNAr 16S, regiões hipervariáveis V4-V5 foram amplificadas usando os iniciadores 515f/806r com sequências de 12 bp como índices de cada amostra, tal como descrito em Caporaso *et al.* (2012) e, de novo, seguindo as recomendações do EMP (<http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/16S/>). Os produtos de PCR foram quantificados, misturados em concentrações equimolares, também de maneira automatizada, e purificados usando o kit *UltraClean PCR Clean-Up* (MO BIO, EUA). As reações de PCR e análises subsequentes foram feitas *Argonne National Laboratory* (Chicago, EUA). Os amplicons de RNAr 16S foram então sequenciados na *IGSB Next Generation Sequencing Core*, prestadora de serviço do referido laboratório, usando um sequenciamento pareado de 150 bp na plataforma MiSeq do Illumina.

3.2.4 Análise dos dados

As sequências obtidas foram pareadas em uma única sequência e os índices para a identificação foram associados às respectivas amostras usando o programa QIIME 1.7 (CAPORASO *et al.* 2010a). As sequências foram então alinhadas usando o PyNASt (CAPORASO *et al.* 2010b) e assinaladas a UTOs usando o GreenGenes (97% de similaridade) (EDGAR, 2010). A tabela final de UTOs foi construída excluindo as sequências que não foram alinhadas, os *singletons* e as sequências que foram identificadas como cloroplastos e mitocôndrias (KLINDWORTH *et al.* 2013).

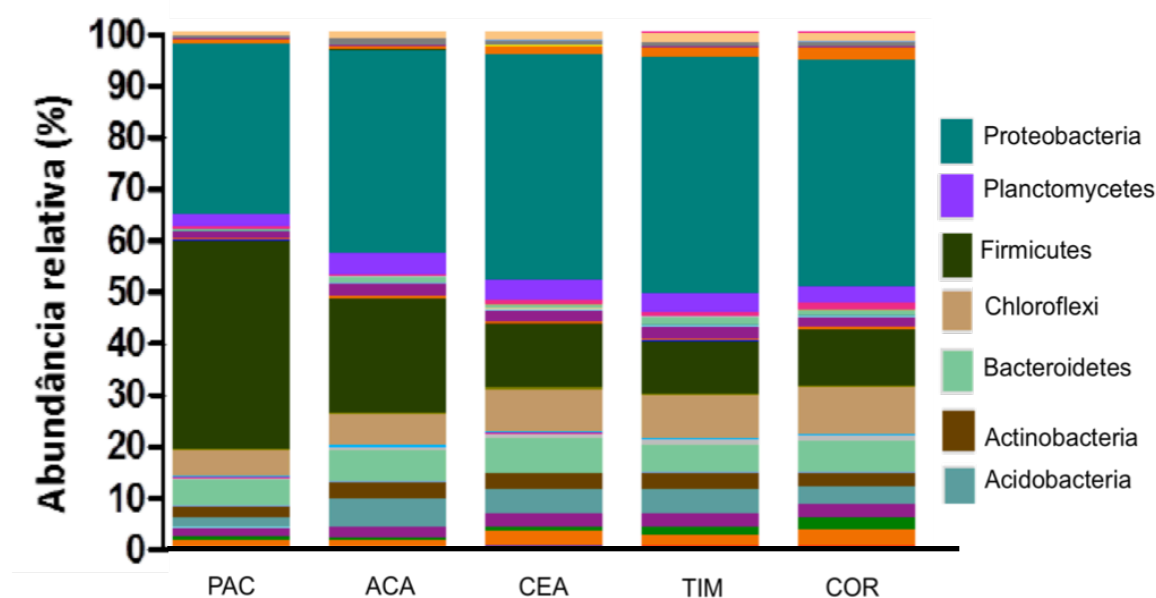
O programa QIIME 1.7 (CAPORASO *et al.* 2010a) também foi utilizado para as análises estatísticas e, para evitar vieses (*bias*) derivados do número diferente de sequências obtidas para cada amostra, a tabela de UTOs foi padronizada para possuir 1.000 sequências por amostra. Estimativas de alfa diversidade (índices de Shannon, equitatividade, Chao1 e número de espécies) e beta diversidade usando a distância UniFrac foram calculadas e análises de coordenadas principais (PCoA) foram geradas. Análises de similaridade com 999 permutações foram feitas para avaliar a significância das diferenças entre as amostras divididas em diversos grupos (locais de amostragem, pontos de coleta e abundância de determinados UTOs). Análises de variância (ANOVA) com a correção de Bonferroni foram utilizadas para determinar as UTOs que diferiram significativamente em abundância entre as amostras.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Composição taxonômica da microbiota de sedimentos de 5 manguezais do Ceará

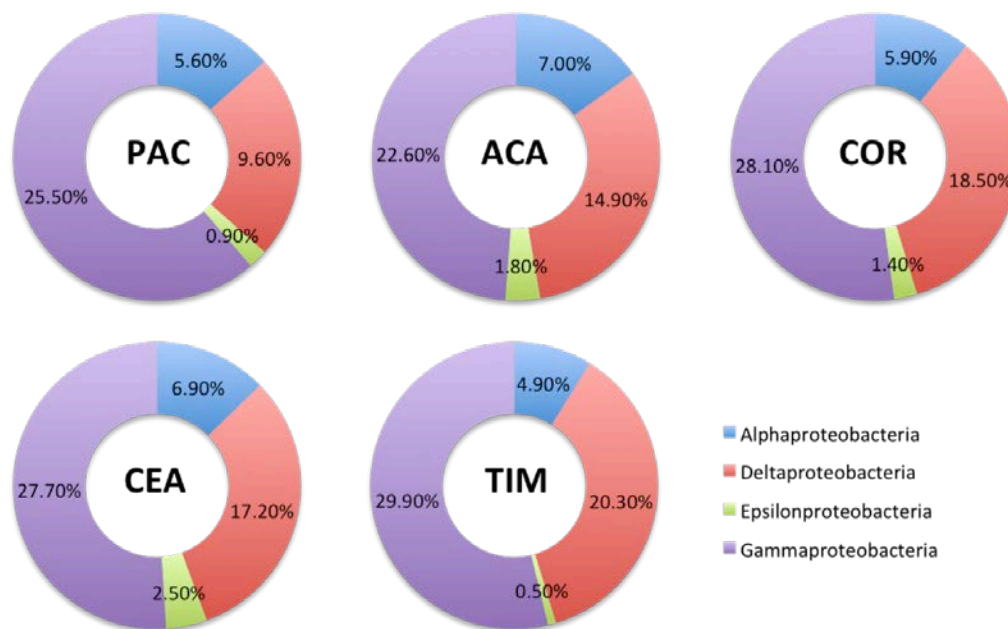
No total foram obtidas 5.094.521 sequências, as quais foram classificadas em 115.360 UTOs. Na figura 3.1 está representada a distribuição de filos nos 5 manguezais. Em todos os manguezais, com exceção do Pacoti, foi evidenciada a predominância do filo Proteobacteria. No Pacoti, Firmicutes foi o filo predominante. Vale ressaltar também uma grande abundância de Firmicutes no manguezal do Acaraú, quando comparada com os outros manguezais. Outros filos como Planctomycetes, Chloroflexi, Bacteroidetes, Actinobacteria e Acidobacteria estão entres os mais abundantes em todos os manguezais.

Figura 3.1 – Distribuição dos principais filos nos 5 manguezais estudados.



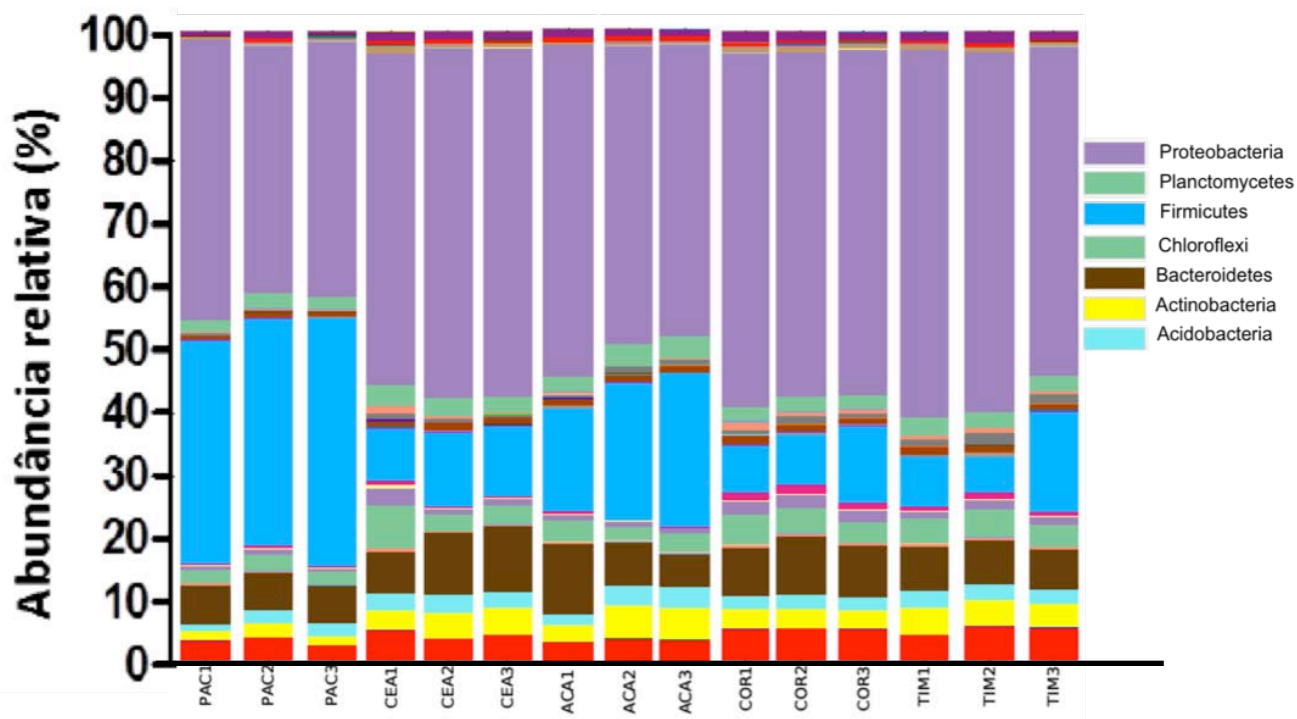
Ao analisar somente as classes de Proteobacteria (FIGURA 3.2), Gammaproteobacteria, seguida de Delta, Alfa e Epsilonproteobacteria foram encontradas em todos os manguezais.

Figura 3.2 – Distribuição de classes de Proteobacteria nos manguezais estudados.



Quanto a distribuição de filos por ponto de coleta nos manguezais (FIGURA 3.3), observa-se que a predominância de Firmicutes no Pacoti ocorre em todos os pontos (com ausência e presença de vegetação de mangue), enquanto que no ponto 3 (área coberta por *A. shaueriana*) dos manguezais de Coreaú, Timonha e Acaraú há um aumento de Firmicutes em relação aos outros pontos. Os outros filos também variam conforme os pontos de coleta, um aumento de Bacteroidetes foi evidenciado no ponto 1 de Acaraú, enquanto os pontos 1 e 2 do Timonha tiveram as maiores abundâncias de Proteobacteria e nos pontos 2 e 3 de Acaraú observou-se uma maior porcentagem de Actinobacteria.

Figura 3.3 – Distribuição dos filos em cada um dos pontos nos manguezais estudados.



3.3.2 Índices de alfa diversidade

Os índices de alfa diversidade estimados para as sequências de sedimentos nos manguezais e pontos estudados estão mostrados na Tabela 3.1. Percebe-se pela análise dos dados que os manguezais do Ceará, Timonha, Acaraú e Coreaú foram os mais diversos, enquanto o Pacoti tem menor diversidade e equitabilidade.

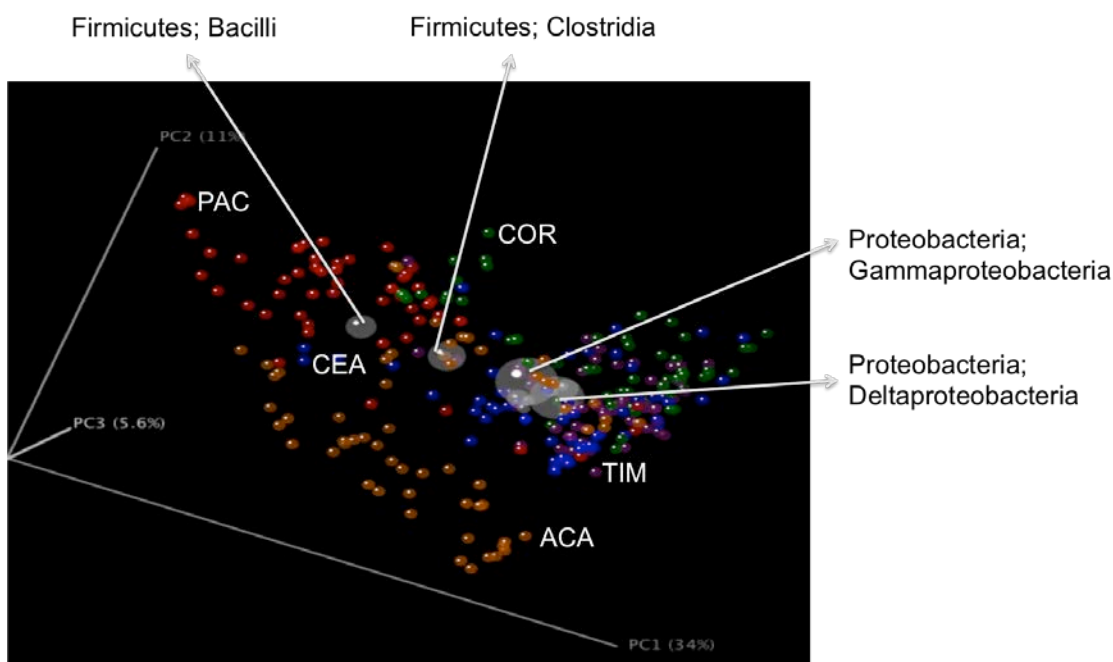
Tabela 3.1 – Índices de alfa diversidade relativos às sequências recuperadas em 5 manguezais do Ceará.

Manguezal	Shannon	Chao1	Espécies observadas	Equitatividade
Pacoti	7,26	1548,31	433,05	0,8313
Ceará	8,65	2359,44	622,72	0,9325
Acaraú	8,28	2131,50	580,45	0,9023
Coreaú	8,61	2318,97	612,91	0,9307
Timonha	8,62	2246,85	611,05	0,9318

3.3.3 Beta diversidade

Nas análises de beta diversidade verificou-se que os manguezais do Pacoti e Acaraú ficaram distantes dos manguezais do Ceará, Timonha e Coreaú que se agruparam mais proximamente (FIGURA 3.4) Foi feito também um biplot para se saber quais classes estariam contribuindo para a dispersão das amostras. As classes Bacilli e Clostridia, do filo Firmicutes foram as responsáveis pela distribuição do Pacoti, enquanto as classes Gamma e Deltaproteobacteria foram as responsáveis pela distribuição de Timonha, Ceará e Coreaú.

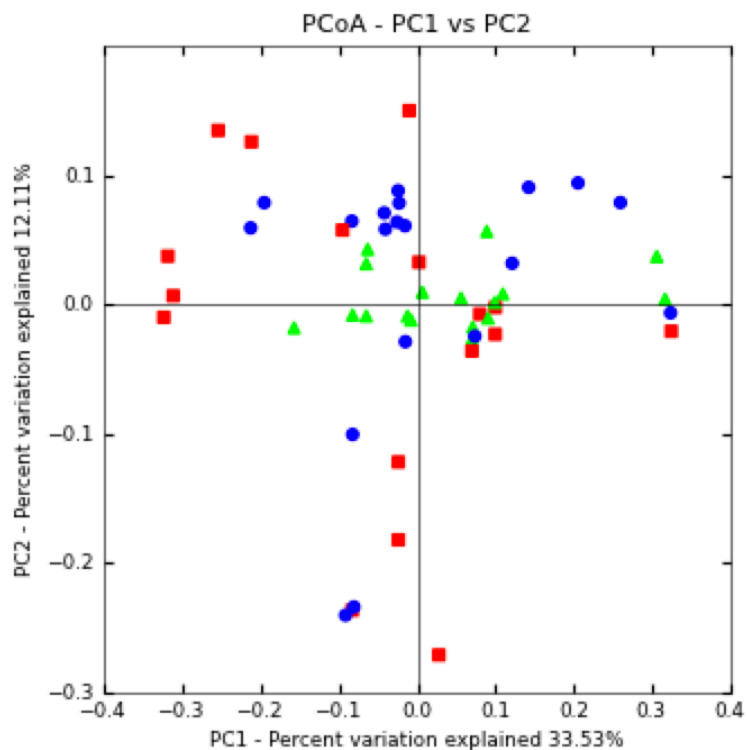
Figura 3.4 – Análise de coordenadas principais (PCoA) em 3 dimensões usando a distância UniFrac ponderada mostrando a dispersão das amostras dos 5 manguezais. As coordenadas 1, 2 e 3 explicaram 34, 11 e 5,6% da variabilidade dos dados, respectivamente. Os círculos brancos representam as classes que mais contribuíram para a dispersão dos dados.

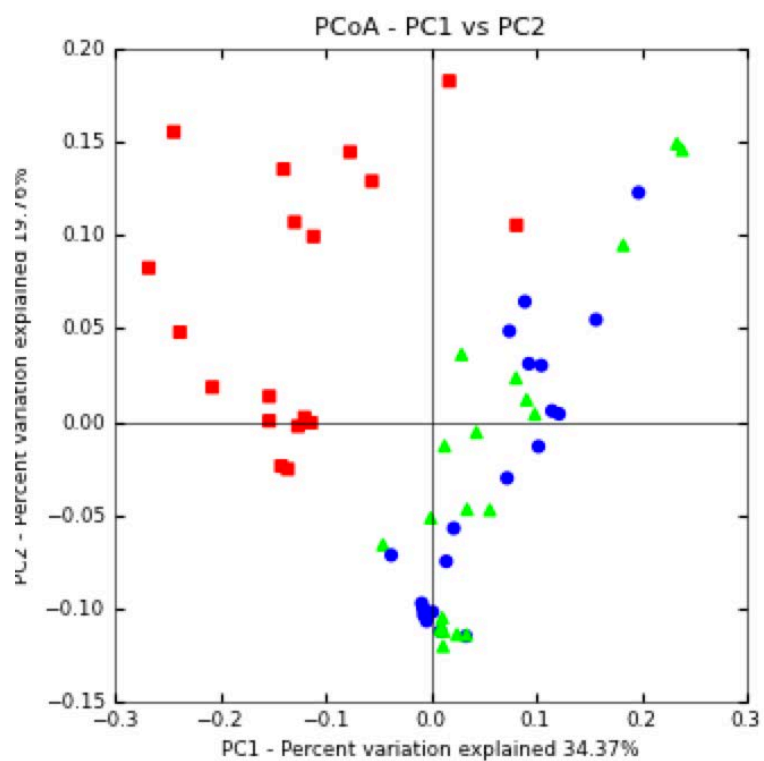
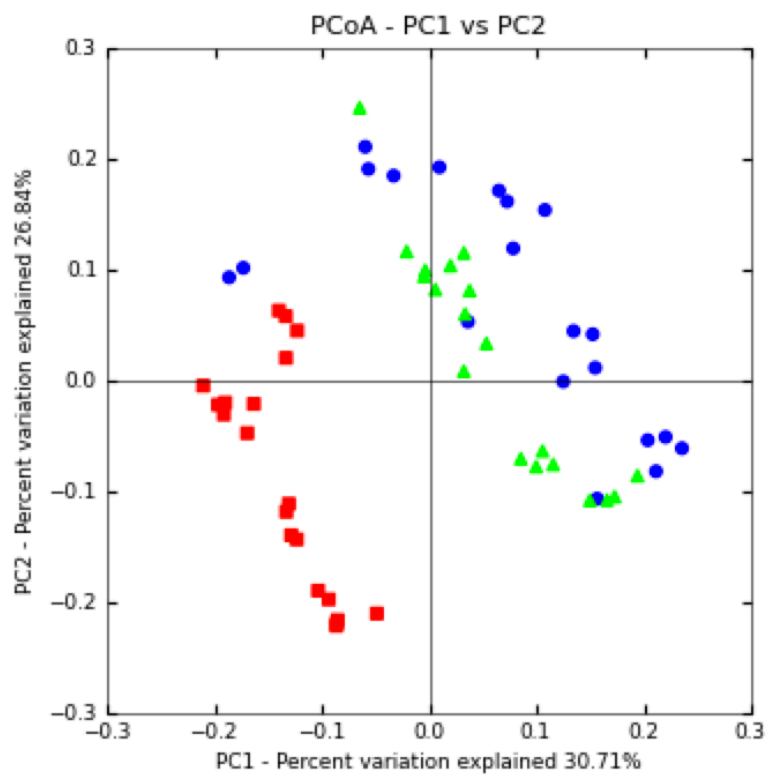


Analisando a dispersão obtida para cada ponto em cada manguezal, observa-se que, em geral, as amostras do ponto 1 ficaram separadas dos pontos 2 e 3 (FIGURA 3.5).

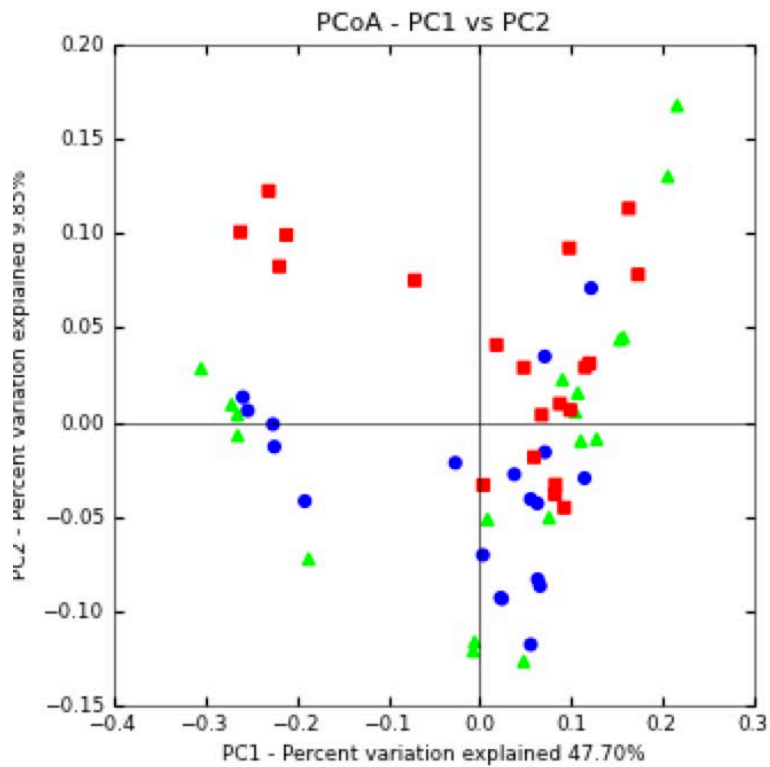
Figura 3.5 – Análise de coordenadas principais (PCoA) usando a distância UniFrac ponderada mostrando a dispersão das amostras em cada um dos pontos nos 5 manguezais. A- Pacoti, B- Ceará, C- Acaraú, D-Coreaú, E- Timonha.

A

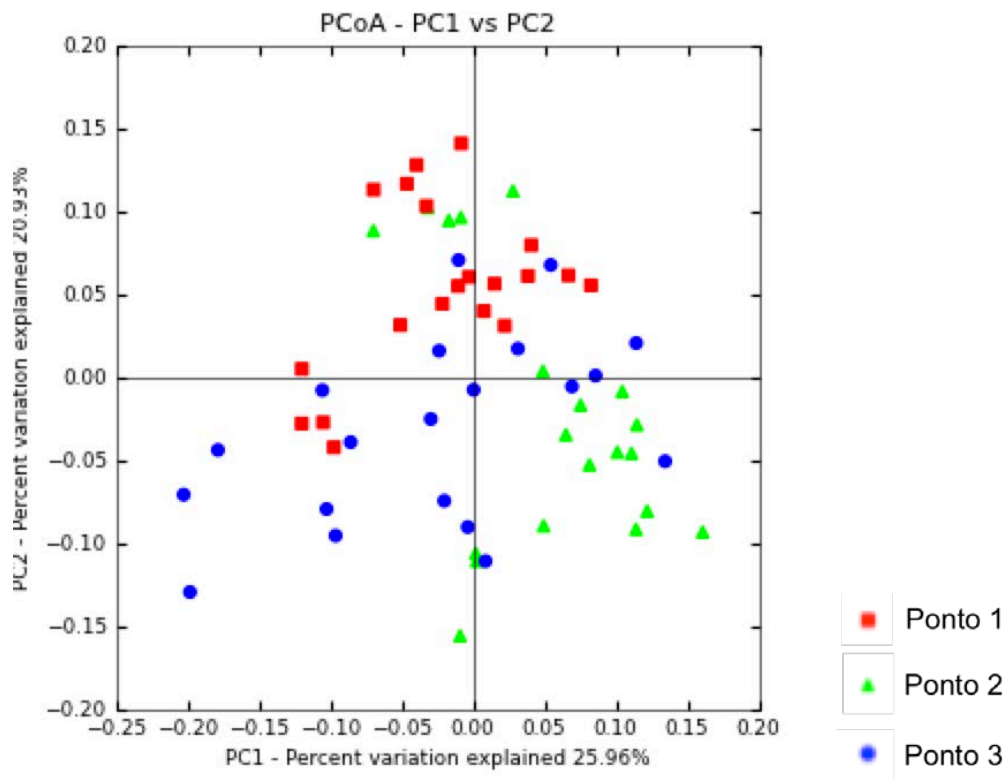


B**C**

D



E



3.3.4 Análises de similaridade

Para analisar a significância estatística da distribuição dos dados foi utilizado o teste PERMDISP, o qual compara as dispersões multivariadas entre grupos com base de qualquer distância ou medida de dissimilaridade, neste caso foi escolhida a distância UniFrac ponderada. Mais especificamente, este teste pode ser considerado em duas etapas: (1) o cálculo das distâncias a partir de observações para os seus centróides e (2) comparação da média destas distâncias entre os grupos, utilizando-se ANOVA. Um valor de p é obtido usando permutação das observações. Na tabela 3.2 estão mostrados os valores de p obtidos para os manguezais e todos os pontos dentro dos manguezais. Pode-se afirmar que todos os manguezais foram estatisticamente diferentes entre si, com exceção dos manguezais do Coreaú e do Ceará.

Tabela 3.2 - Valores de p obtidos pelo teste PERMDISP para cada manguezal usando a distância UniFrac ponderada. Os valores observados de p estão acima da diagonal, enquanto que os abaixo da diagonal são os valores de p após as permutações.

	PAC	CEA	ACA	COR	TIM
PAC		0,001*	0,024*	0,001*	0,001*
CEA	1,1615e-06*		0,003*	0,133	0,005*
ACA	0,017*	5,8168e-05*		0,039*	0,001*
COR	6,2118e-04*	0,146	0,03		0,001*
TIM	8,1834e-14*	0,005*	1,5247e-15*	3,4160e-05 *	

*Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

O PERMDISP também foi aplicado em cada um dos pontos do manguezal (Tabela 3.3) e evidenciou-se que nos manguezais do Acaraú e Timonha o ponto 1 foi diferente estatisticamente do ponto 3; no Pacoti o ponto 2 foi diferente do ponto 1, enquanto no Ceará e Coreaú não houve diferença estatística entre os pontos. A comunidade microbiana dos manguezais dos rios Ceará, Timonha e Coreaú se mostraram mais semelhantes entre si, apesar de o Timonha ter sido considerado estatisticamente diferente. Essa semelhança pode ser atribuída principalmente à abundância dos filos Proteobacteria e Firmicutes, à família Desulfobacteriaceae e à ordem Chromatiales nesses manguezais.

As análises entre as estações e anos de coleta, não mostraram valores significativos, por este motivo foram omitidas.

Tabela 3.3 – Valores de p obtidos pelo teste PERMDISP para cada ponto nos manguezais usando a distância UniFrac ponderada. Os valores observados de p estão acima da diagonal, enquanto que os abaixo da diagonal são os valores de p após as permutações.

	Pacoti			Ceará			Acaraú			Coreaú			Timonha		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1		0,007*	0,315		0,651	0,088		0,16	0,005*		0,273	0,987		0,068	0,015*
2	0,004*		0,054	0,532		0,323	0,135		0,074	0,286		0,242	0,073		
3	0,311	0,058		0,098	0,322		0,004*	0,076		0,987	0,249		0,017*	0,335	0,353

*Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

3.3.5 Análise de variância (ANOVA)

Para determinar as UTOs que diferiram significativamente em abundância entre as amostras foi feita uma análise de variância (ANOVA) com a correção de Bonferroni, que padroniza os dados os dividindo pelo número de amostras para diminuir a chance de falsos valores significativos.

Na tabela 3.4 estão representados somente os gêneros cujas abundâncias foram consideradas estatisticamente diferentes entre os manguezais. Em termos de outros níveis taxonômicos, a ANOVA revelou que a maior abundância de Firmicutes nos manguezais do Pacoti e Acaraú só foi estatisticamente significativa para o Pacoti. Este filo foi representado principalmente pelas classes Clostridia e Bacilli. Uma alta abundância do gênero *Vibrio* foi detectada no manguezal rio Coreaú, mais especificamente em todos os pontos da segunda coleta do período chuvoso.

Na tabela 3.5 estão representados os gêneros que diferiram significativamente entre os pontos de coleta em todos os manguezais. Destaca-se uma maior abundância dos gêneros, *Haloplasma*, *Exiguobacterium*, *Halomonas*, *Marinobacter*, *Erythrobacter* e *Pontibacillus* no ponto 1 do manguezal do Pacoti; dos gêneros *Lutimonas*, C1_B004, *Thalassomonas*, *Ruegeria* e *Congregibacter* no ponto 1 do manguezal do Acaraú; *Lewinella*, *Novosphingobium*, *Nitrospira* no ponto 2; e *Candidatus Nitrososphaera*, *Bacillus*, *Pelobacter* e *Rhodoplanes* no ponto 3; e *Desulfobulbus* nos dois pontos vegetados do Acaraú. Esses dois manguezais foram os que mais tiveram gêneros com abundâncias significativamente diferentes, o que provavelmente explica a sua dispersão bastante separada nas análises de PCoA (FIGURA 3.5).

Tabela 3.4 – ANOVA mostrando os gêneros nos quais houve diferença significativa na abundância relativa entre os manguezais. Em negrito estão destacados os maiores valores de abundância relativa.

Correção de Bonferroni	Pacoti	Ceará	Acaraú	Coreaú	Timonha	Gênero
1,26E-15	0,14%	1,45%	0,61%	0,53%	0,26%	Proteobacteria; Epsilonproteobacteria; Campylobacterales; <i>Sulfurovum</i>
2,26E-15	0,00%	0,05%	0,21%	0,04%	0,01%	Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; Saprospiraceae; <i>Lewinella</i>
1,75E-11	0,14%	0,85%	0,42%	0,35%	0,41%	Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; <i>Lutimonas</i>
2,88E-11	1,65%	0,22%	0,44%	0,24%	0,41%	Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococcaceae; <i>Tepidibacter</i>
4,55E-11	0,01%	0,00%	0,13%	0,00%	0,00%	Crenarchaeota; Thaumarchaeota; Nitrososphaerales; Nitrososphaeraceae; Candidatus Nitrososphaera
2,05E-08	0,03%	0,01%	0,14%	0,01%	0,01%	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae; <i>Rhodoplanes</i>
1,36E-07	0,19%	0,31%	0,11%	0,54%	0,46%	Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Syntrophobacterales; Desulfobacteraceae; <i>Desulfobacterium</i>
1,46E-07	0,42%	0,10%	0,26%	0,06%	0,04%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Bacillus</i>
1,79E-07	2,58%	0,57%	1,04%	0,91%	0,12%	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Alteromonadaceae; <i>Microbulbifer</i>
3,81E-07	0,00%	0,01%	0,07%	0,00%	0,00%	Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfobacteriales; Desulfobulbaceae; <i>Desulfobulbus</i>
4,45E-07	0,27%	0,00%	0,01%	0,04%	0,01%	Firmicutes; Bacilli; Haloplasmatales; Haloplasmataceae; <i>Haloplasma</i>
6,79E-06	0,00%	0,10%	0,00%	0,03%	0,04%	Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Syntrophobacterales; Desulfobacteraceae; <i>Desulfococcus</i>
4,02E-05	0,09%	0,00%	0,02%	0,01%	0,00%	Firmicutes; Bacilli; Exiguobacterales; Exiguobacteraceae;

						<i>Exiguobacterium</i>
7,05E-05	1,32%	0,13%	0,16%	2,69%	0,05%	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Vibrionaceae; <i>Vibrio</i>
0,000115864	0,12%	0,01%	0,03%	0,01%	0,00%	Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; <i>Clostridium</i>
0,00043163	0,00%	0,02%	0,02%	0,42%	0,01%	Proteobacteria; Deltaproteobacteria; <i>Desulfovibrionales</i> ; <i>Desulfovibrionaceae</i> ; <i>Desulfovibrio</i>
0,000822773	0,04%	0,01%	0,00%	0,37%	0,01%	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Oceanospirillaceae; <i>Marinobacterium</i>
0,002739298	0,72%	0,00%	0,01%	0,02%	0,00%	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Halomonadaceae; <i>Halomonas</i>
0,01455377	0,04%	0,06%	0,18%	0,11%	0,05%	Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfuromonadales; Pelobacteraceae; <i>Pelobacter</i>
0,02506489	0,63%	0,05%	0,01%	0,01%	0,01%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Pontibacillus</i>
0,02625567	0,01%	0,01%	0,06%	0,01%	0,00%	Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Syntrophobacterales; Syntrophaceae; <i>Desulfobacca</i>
0,036942278	0,07%	0,00%	0,03%	0,01%	0,00%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Halobacillus</i>

Tabela 3.5 – ANOVA mostrando os gêneros nos quais houve diferença significativa na abundância relativa entre os pontos de coleta nos manguezais. Em negrito estão destacados os maiores valores de abundância relativa.

Correção de Bonferroni	PAC1	PAC2	PAC3	CEA1	CEA2	CEA3	ACA1	ACA2	ACA3	COR1	COR2	COR3	TIM1	TIM2	TIM3	Gênero
1,92E-26	0,29%	0,05%	0,07%	1,00%	1,18%	2,13%	1,54%	0,24%	0,07%	0,76%	0,42%	0,41%	0,25%	0,34%	0,20%	Proteobacteria; Epsilonproteobacteria; Campylobacteriales; <i>Sulfurovum</i>
1,06E-23	0,01%	0,00%	0,00%	0,01%	0,08%	0,06%	0,03%	0,29%	0,31%	0,01%	0,05%	0,06%	0,00%	0,02%	0,02%	Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; Saprospiraceae; <i>Lewinella</i>
1,97E-20	0,22%	0,16%	0,03%	0,80%	0,87%	0,87%	0,98%	0,29%	0,02%	0,56%	0,27%	0,22%	0,59%	0,36%	0,29%	Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; <i>Lutimonas</i>
1,02E-18	0,01%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,14%	0,24%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	Crenarchaeota; Thaumarchaeota; Nitrososphaerales; Nitrososphaeraceae; <i>Candidatus Nitrososphaera</i>
5,62E-13	0,18%	0,31%	0,10%	0,68%	0,18%	0,11%	0,26%	0,05%	0,03%	0,49%	0,72%	0,41%	0,43%	0,61%	0,34%	Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Syntrophobacteriales; Desulfobacteraceae; <i>Desulfobacterium</i>
4,73E-11	0,03%	0,25%	0,16%	0,07%	0,38%	0,50%	0,05%	0,49%	0,34%	0,06%	0,31%	0,31%	0,04%	0,25%	0,18%	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; <i>Novosphingobium</i>
7,33E-11	0,10%	0,12%	0,08%	0,03%	0,14%	0,06%	0,13%	0,31%	1,05%	0,04%	0,02%	0,02%	0,00%	0,01%	0,04%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Bacillus</i>
1,57E-09	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,01%	0,00%	0,09%	0,10%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfobacteriales; Desulfobulbaceae; <i>Desulfobulbus</i>
2,76E-09	0,16%	0,05%	0,01%	0,24%	0,16%	0,13%	0,08%	0,03%	0,02%	0,25%	0,24%	0,12%	0,31%	0,32%	0,49%	Nitrospirae; Nitrospira; Nitrospirales; Thermodesulfobibrionaceae; LCP-6

4,52E-09	0,02%	0,04%	0,06%	0,07%	0,04%	0,08%	0,01%	0,18%	0,34%	0,03%	0,12%	0,17%	0,02%	0,04%	0,09%	Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfuromonadales; Pelobacteraceae; <i>Pelobacter</i>
5,42E-09	0,01%	0,01%	0,01%	0,00%	0,06%	0,02%	0,04%	0,12%	0,01%	0,00%	0,19%	0,04%	0,03%	0,29%	0,02%	Nitrospirae; Nitrospira; Nitrospirales; Thermodesulfobibrionaceae; BD2-6
3,27E-08	0,02%	0,05%	0,02%	0,00%	0,02%	0,00%	0,05%	0,16%	0,22%	0,00%	0,01%	0,03%	0,00%	0,01%	0,02%	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae; <i>Rhodoplanes</i>
6,79E-08	1,72%	0,25%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,02%	0,01%	0,02%	0,00%	0,01%	0,00%	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Halomonadaceae; <i>Halomonas</i>
4,84E-07	0,14%	0,09%	0,07%	0,46%	0,17%	0,41%	0,52%	0,09%	0,09%	0,41%	0,31%	0,29%	0,21%	0,29%	0,23%	Chloroflexi; Anaerolineae; Anaerolineales; Anaerolinaceae; C1_B004
5,20E-07	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,02%	0,01%	0,15%	0,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Colwelliaceae; <i>Thalassomonas</i>
9,21E-07	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,01%	0,00%	0,12%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	Nitrospirae; Nitrospira; Nitrospirales; Nitrospiraceae; <i>Nitrospira</i>
5,50E-06	3,83%	0,05%	0,24%	0,02%	0,00%	0,02%	0,07%	0,00%	0,01%	0,13%	0,01%	0,06%	0,01%	0,02%	0,00%	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Alteromonadaceae; <i>Marinobacter</i>
6,48E-06	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,01%	0,00%	0,09%	0,02%	Nitrospirae; Nitrospira; Nitrospirales; Thermodesulfobibrionaceae; GOUTA19
2,06E-05	0,00%	0,04%	0,40%	0,02%	0,01%	0,03%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,16%	0,16%	0,00%	0,00%	0,00%	Tenericutes; Erysipelotrichi; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae; <i>Clostridium</i>
2,37E-05	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,15%	0,04%	0,01%	0,00%	0,00%	0,04%	0,03%	0,01%	0,01%	0,05%	0,05%	Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Syntrophobacteriales; Desulfobacteraceae;

																<i>Desulfococcus</i>
4,29E-05	0,42%	0,17%	0,20%	0,01%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,02%	0,00%	0,03%	0,07%	0,01%	0,01%	0,00%	Firmicutes; Bacilli; Haloplasmatales; Haloplasmataceae; <i>Haloplasma</i>
5,41E-05	3,24%	2,05%	2,34%	0,39%	0,68%	0,62%	0,32%	1,19%	1,58%	0,46%	0,96%	1,29%	0,08%	0,11%	0,18%	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Alteromonadaceae; <i>Microbulbifer</i>
0,000137089	0,11%	0,07%	0,07%	0,53%	0,21%	0,17%	0,23%	0,09%	0,06%	0,15%	0,24%	0,17%	0,10%	0,32%	0,31%	Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Syntrophobacterales; Desulfobacteraceae; <i>Desulfosarcina</i>
0,000252791	0,00%	0,03%	0,09%	0,00%	0,03%	0,00%	0,00%	0,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	Planctomycetes; Planctomycea; Pirellulales; Pirellulaceae; A17
0,000733103	0,28%	0,17%	0,06%	0,26%	0,24%	0,29%	0,35%	0,07%	0,01%	0,23%	0,12%	0,09%	0,20%	0,08%	0,10%	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; <i>Ruegeria</i>
0,000957241	1,22%	3,83%	4,36%	2,06%	3,82%	4,99%	4,43%	1,61%	0,96%	0,83%	1,84%	2,51%	2,57%	1,99%	6,82%	Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococcaceae; <i>Tepidibacter</i>
0,001487528	0,00%	0,07%	0,01%	0,00%	0,07%	0,00%	0,02%	0,02%	0,01%	0,02%	0,15%	0,04%	0,00%	0,05%	0,04%	Spirochaetes; Spirochaetes; Spirochaetales; Spirochaetaceae; P30-6
0,00179087	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,01%	0,03%	0,00%	0,08%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,02%	0,01%	Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Verrucomicrobiaceae; <i>Verrucomicrobium</i>
0,002626794	0,53%	0,09%	0,14%	0,09%	0,12%	0,15%	0,20%	0,04%	0,07%	0,13%	0,08%	0,08%	0,02%	0,04%	0,03%	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Erythrobacteraceae; <i>Erythrobacter</i>
0,005250609	0,00%	0,01%	0,00%	0,07%	0,00%	0,00%	0,05%	0,00%	0,00%	0,11%	0,49%	0,65%	0,01%	0,01%	0,00%	Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae; <i>Desulfovibrio</i>
0,007059797	0,16%	0,12%	0,07%	0,04%	0,18%	0,24%	0,45%	0,17%	0,16%	0,04%	0,09%	0,15%	0,07%	0,09%	0,06%	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; OM60;

																<i>Congregibacter</i>
0,007725035	0,17%	0,09%	0,09%	0,00%	0,00%	0,01%	0,08%	0,02%	0,04%	0,03%	0,05%	0,03%	0,01%	0,00%	0,00%	Firmicutes; Bacilli; Exiguobacteriales; Exiguobacteraceae; <i>Exiguobacterium</i>
0,011998449	0,02%	0,04%	0,06%	0,03%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,64%	0,31%	0,16%	0,00%	0,00%	0,02%	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Oceanospirillaceae; <i>Marinobacterium</i>
0,015750078	0,21%	0,95%	2,74%	0,34%	0,05%	0,02%	0,01%	0,09%	0,36%	2,35%	2,81%	2,92%	0,01%	0,04%	0,09%	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Vibrionaceae; <i>Vibrio</i>
0,027894323	0,12%	0,20%	0,03%	0,08%	0,02%	0,01%	0,01%	0,02%	0,05%	0,03%	0,02%	0,08%	0,00%	0,01%	0,05%	Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; <i>Natronincola</i>
0,049316041	1,19%	0,12%	0,49%	0,04%	0,06%	0,04%	0,00%	0,04%	0,00%	0,03%	0,00%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Pontibacillus</i>

3.3.6 Composição e alfa diversidade de Archaea

Do total de 115.360 UTOs obtidas, em média 3,4% foram classificadas como pertencentes ao domínio Archaea. Estas foram associadas aos filos Crenarchaeota e Euryarchaeota, com o primeiro sendo predominante nos 5 manguezais. A tabela 3.6 mostra a distribuição de arqueias nos manguezais e pontos estudados. O manguezal do Rio Coreaú teve o maior número de sequências classificadas como arqueias, seguido pelo manguezal do rio Ceará, o qual teve a maior abundância de arqueias no sedimento sem vegetação. O manguezal do Ceará apresentou alguns gêneros que foram exclusivos a ele, tais como *Halobacterium*, *Natrococcus* e *Thermogymnomonas* (TABELA 3.9).

Tabela 3.6 – Abundância dos filos de Archaea nos manguezais estudados.

	Crenarchaeota	Euryarchaeota
Pacoti	1,2%	0,8%
Ceará	2,9%	0,9%
Acaraú	1,3%	0,5%
Coreaú	3,2%	2,2%
Timonha	2,0%	1,6%

Tabela 3.7 – Abundância dos filos de Archaea em cada ponto nos manguezais estudados.

	Crenarchaeota	Euryarchaeota
PAC 1	1,0%	0,7%
PAC 2	1,4%	0,9%
PAC 3	1,1%	0,8%
CEA 1	5,3%	1,4%
CEA 2	1,7%	0,6%
CEA 3	1,8%	0,8%
ACA 1	1,1%	0,7%
ACA 2	1,5%	0,3%
ACA 3	1,4%	0,4%
COR 1	3,3%	2,3%
COR 2	3,3%	2,3%
COR 3	3,0%	1,9%
TIM 1	1,6%	1,4%
TIM 2	2,3%	2,0%
TIM 3	2,1%	1,4%

Tabela 3.8 – Abundância relativa dos gêneros de Archaea nos manguezais. Em negrito estão destacados os maiores valores de abundância relativa.

PAC	CEA	ACA	COR	TIM	Táxon
0,00981%	0,09414%	0,02271%	0,02483%	0,02833%	Archaea; Crenarchaeota; Thaumarchaeota; Cenarchaeales; Cenarchaeaceae; <i>Nitrosopumilus</i>
0,02830%	0,03690%	0,38034%	0,01345%	0,00433%	Archaea; Crenarchaeota; Thaumarchaeota; Nitrososphaerales; Nitrososphaeraceae; <i>Candidatus Nitrososphaera</i>
0,00038%	0,00138%	0,00000%	0,00034%	0,00033%	Archaea; Euryarchaeota; Halobacteria; Halobacteriales; Halobacteriaceae; <i>Haladaptatus</i>
0,00528%	0,00034%	0,00034%	0,00000%	0,00167%	Archaea; Euryarchaeota; Halobacteria; Halobacteriales; Halobacteriaceae; <i>Haloarcula</i>
0,00000%	0,00034%	0,00000%	0,00000%	0,00000%	Archaea; Euryarchaeota; Halobacteria; Halobacteriales; Halobacteriaceae; <i>Halobacterium</i>
0,00264%	0,00000%	0,00034%	0,00000%	0,00000%	Archaea; Euryarchaeota; Halobacteria; Halobacteriales; Halobacteriaceae; <i>Halobaculum</i>
0,00113%	0,00138%	0,00000%	0,00000%	0,00033%	Archaea; Euryarchaeota; Halobacteria; Halobacteriales; Halobacteriaceae; <i>Halococcus</i>
0,02981%	0,00345%	0,00475%	0,00345%	0,00300%	Archaea; Euryarchaeota; Halobacteria; Halobacteriales; Halobacteriaceae; <i>Haloferax</i>
0,00075%	0,00000%	0,00034%	0,00000%	0,00067%	Archaea; Euryarchaeota; Halobacteria; Halobacteriales; Halobacteriaceae; <i>Halogeometricum</i>
0,00566%	0,00034%	0,00237%	0,00207%	0,00067%	Archaea; Euryarchaeota; Halobacteria; Halobacteriales; Halobacteriaceae; <i>Halogramum</i>
0,00000%	0,00000%	0,00034%	0,00000%	0,00000%	Archaea; Euryarchaeota; Halobacteria; Halobacteriales; Halobacteriaceae; <i>Halonotius</i>
0,00302%	0,00034%	0,00000%	0,00034%	0,00000%	Archaea; Euryarchaeota; Halobacteria; Halobacteriales; Halobacteriaceae; <i>Halorhabdus</i>
0,00038%	0,00034%	0,00034%	0,00000%	0,00000%	Archaea; Euryarchaeota; Halobacteria; Halobacteriales; Halobacteriaceae; <i>Halosimplex</i>
0,00075%	0,00000%	0,00373%	0,00103%	0,00067%	Archaea; Euryarchaeota; Halobacteria; Halobacteriales; Halobacteriaceae; <i>Haloterrigena</i>

0,00000%	0,00034%	0,00000%	0,00000%	0,00000%	Archaea; Euryarchaeota; Halobacteria; Halobacteriales; Halobacteriaceae; <i>Natronococcus</i>
0,01925%	0,00207%	0,00475%	0,00310%	0,00300%	Archaea; Euryarchaeota; Halobacteria; Halobacteriales; Halobacteriaceae; <i>Natronomonas</i>
0,00000%	0,00138%	0,00000%	0,00034%	0,00033%	Archaea; Euryarchaeota; Methanobacteria; Methanobacteriales; MSBL1; SAGMEG-1
0,00075%	0,02000%	0,00814%	0,00241%	0,00000%	Archaea; Euryarchaeota; Methanobacteria; Methanobacteriales; Methanobacteriaceae; <i>Methanobacterium</i>
0,00038%	0,00724%	0,00000%	0,00000%	0,00000%	Archaea; Euryarchaeota; Methanobacteria; Methanobacteriales; Methanobacteriaceae; <i>Methanobrevibacter</i>
0,00000%	0,00069%	0,00034%	0,00000%	0,00000%	Archaea; Euryarchaeota; Methanobacteria; Methanobacteriales; Methanobacteriaceae; <i>Methanospaera</i>
0,00000%	0,00000%	0,00034%	0,00034%	0,00000%	Archaea; Euryarchaeota; Methanococci; Methanococcales; Methanococcaceae; <i>Methanococcus</i>
0,00000%	0,00000%	0,00068%	0,00000%	0,00033%	Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanocellales; Methanocellaceae; <i>Methanocella</i>
0,00000%	0,00000%	0,00000%	0,00241%	0,00067%	Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanomicrobiales; Methanomicrobiaceae; <i>Methanogenium</i>
0,00000%	0,00034%	0,00169%	0,00000%	0,00000%	Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanomicrobiales; Methanoregulaceae; <i>Methanolinea</i>
0,00000%	0,00241%	0,00441%	0,00000%	0,00033%	Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanosarcinales; Methanosactaceae; <i>Methanosaeta</i>
0,00038%	0,00414%	0,00237%	0,00172%	0,00200%	Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanosarcinales; Methanosarcinaceae; <i>Methanococcoides</i>
0,00566%	0,00655%	0,00475%	0,01276%	0,00800%	Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanosarcinales; Methanosarcinaceae; <i>Methanolobus</i>
0,00075%	0,00276%	0,00542%	0,00379%	0,00133%	Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanosarcinales; Methanosarcinaceae; <i>Methanosarcina</i>
0,00000%	0,00034%	0,00000%	0,00000%	0,00000%	Archaea; Euryarchaeota; Thermoplasmata; Thermoplasmatales; Picophilaceae; <i>Thermogymnomonas</i>

Os índices de alfa diversidade, apresentados na Tabela 3.10, mostram que os valores do índice de Shannon foram maiores no manguezal do rio Timonha seguido pelo manguezal do rio Ceará, a equitatividade atingiu maiores valores no Pacoti e menores no Coreaú.

Tabela 3.9 – Índices de alfa diversidade de Archaea nos manguezais.

Manguezal	Shannon	Equitatividade
Pacoti	2,10	0,78
Ceará	2,25	0,76
Acaraú	2,06	0,75
Coreaú	2,07	0,68
Timonha	2,26	0,75

Tabela 3.10 – Índices de alfa diversidade de Archaea dos pontos nos manguezais estudados.

	Shannon	Equitatividade
PAC 1	2,19	0,77
PAC 2	2,02	0,75
PAC 3	2,10	0,81
CEA 1	2,09	0,66
CEA 2	2,35	0,81
CEA 3	2,32	0,81
ACA 1	2,15	0,76
ACA 2	1,99	0,76
ACA 3	2,03	0,74
COR 1	2,06	0,67
COR 2	2,06	0,68
COR 3	2,08	0,70
TIM 1	2,38	0,76
TIM 2	2,20	0,73
TIM 3	2,21	0,75

3.4 DISCUSSÃO

A diversidade taxonômica em sedimentos de manguezais submetidos a diferentes tipos de impacto foi investigada neste trabalho utilizando sequenciamento em larga escala da região de variabilidade V4 do gene que codifica para o RNAr 16S. Este é o primeiro trabalho de sequenciamento em larga escala de sedimentos de manguezais que se tem conhecimento, no qual foram analisadas o maior número de amostras (um total de 300). Também, é o primeiro a detectar a predominância de Firmicutes em um manguezal, em vez de Proteobacteria, filo mais abundante

nos outros manguezais analisados neste estudo e em outros trabalhos (NOGUEIRA, 2011; ROCHA; 2012; ANDREOTE *et al.*, 2012).

A maior abundância de Firmicutes no manguezal do Pacoti pode ser atribuída às alterações geomorfológicas decorrentes de barramentos ao longo do rio, que geram uma maior entrada de água salgada com a conseqüente salinização e deposição de sedimentos grossos que por sua vez retêm menos matéria orgânica e nutrientes. O aumento da salinidade associado à diminuição da matéria orgânica pode ter contribuído para a seleção de bactérias Gram-positivas, que possuem parede celular mais espessa, assim como produtoras de esporos, que podem suportar melhor as pressões ambientais desfavoráveis (SCHIMEL; BALSER ; WALLENSTEIN, 2007)

Essa predominância de Firmicutes também refletiu nos índices de alfa diversidade que acusaram menor diversidade e equitatividade neste manguezal em comparação aos demais. Este filo foi representado principalmente pelas classes Clostridia e Bacilli.

Quanto ao filo Proteobacteria, as classes Gamma, Delta, e Alphaproteobacteria foram as mais abundantes. A dominância de Proteobacteria (com percentual de 40-60%) e das classes Delta e Gammaproteobacteria nos sedimentos de manguezais brasileiros é notável, independente das pressões existentes e das metodologias de estudo aplicadas (NOGUEIRA, 2011). Esse filo também foi dominante em manguezais da China (LIANG *et al.*, 2007) e da Índia (GHOSH *et al.*, 2010) representando mais de 50% das sequências analisadas (NOGUEIRA, 2011). No entanto, já foram reportadas diferenças na distribuição das classes de Proteobacteria em manguezais. Por exemplo, as classes Gamma, Epsilon e Alpha foram descritas como dominantes em um manguezal da China, enquanto Gamma, Delta e Betaproteobacteria foram as mais abundantes em um manguezal da Índia. Ambos os estudos foram realizados em manguezais com históricos de contaminação com hidrocarbonetos, petróleo e metais pesados (SAHA *et al.*, 2006; BINELLI *et al.*, 2007).

Analisando os gêneros que ocorreram nos sedimentos dos manguezais detectou-se a presença de gêneros de bactérias que reduzem enxofre, sulfatos e outros compostos de enxofre a H₂S. Alguns gêneros reduzem enxofre elementar enquanto outras reduzem compostos de enxofre, todas produzindo H₂S, composto que é responsável pelo odor característico dos manguezais.

A diversidade microbiana é geralmente definida como o número de indivíduos atribuídos a táxons diferentes e a sua distribuição entre os táxons (ATLAS; BARTHA, 1998). Quando se trata de paisagem, a diversidade pode ser interpretada em diferentes níveis: dentro de um mesmo habitat é chamada de alfa diversidade, ao longo de um gradiente de habitats tem-se a beta diversidade e à riqueza de espécies em uma variedade de habitats denomina-se gama diversidade. Este conceito, plausível para diversidade em habitats tradicionais, vem sendo aplicado para os micro-organismos do solo. Entretanto, deve-se ter em mente que os solos são estratificados, com horizontes distintos, podendo ainda estar ou não recobertos com vegetação, possibilitando a existência de diferentes micro-habitats, os quais podem ser considerados como entidades separadas. Portanto, ainda não se sabe como incorporar a diversidade desses micro-habitats em um conceito geral de diversidade do solo (LYNCH *et al.*, 2004).

De acordo com as análises de ANOVA o gênero *Microbulbifer* foi encontrado em maior abundância no manguezal do Coreaú. Nogueira (2011) analisando bibliotecas de clones do manguezal do Jaguaribe, região leste do estado, também encontrou o gênero *Microbulbifer* neste manguezal. Este gênero já foi reportado também para outros manguezais brasileiros (BRITO *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2008).

Outro gênero também foi encontrado em maior abundância no Coreaú, de acordo com as ANOVA, foi o gênero *Vibrio*, principalmente no período chuvoso do segundo ano de coleta, o qual apresentou maior pluviometria (TABELA 2.1). O gênero *Vibrio* é nativo de ambientes marinhos e estuarinos que são usados para o estabelecimento de fazendas de camarão (THOMPSON *et al.*, 2004). Algumas espécies são patógenos oportunistas de camarões (SAULNIER *et al.*, 2000) outras espécies deste gênero estão envolvidas na ciclagem de nutrientes e outras espécies relacionadas com a degradação de quitina e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, os quais são extremamente tóxicos para o ambiente (SOUSA *et al.*, 2006).

Ainda encontrado em maior abundância no Coreaú foi o gênero *Marinobacterium* da classe Gammaproteobacteria. No trabalho de Nogueira (2011), também foi encontrado este gênero, o qual também já foi encontrado em sedimentos de manguezais brasileiros tendo sido relacionado com contaminação por petróleo (NUNES, 2006) e em microcosmos constituindo 1% das sequências da família Alteromonadales antes da contaminação com óleo e até 50% após alguns dias de cultivo (SANTOS *et al.*, 2011).

O ponto 1 (sem vegetação) do manguezal do Pacoti destacou-se especialmente por ser considerado estatisticamente diferente de todos os pontos de todos os outros manguezais, com exceção do ponto 3 (zona de raízes de *A. shaueriana*) do Pacoti. Este ponto também apresentou mais gêneros com a abundância relativa estatisticamente maiores quando comparado com os outros pontos de todos os outros manguezais, esses gêneros foram *Haloplasma*, *Exiguobacterium*, *Halomonas*, *Marinobacter*, *Erythrobacter* e *Pontibacillus*.

Os gêneros *Halomonas* e *Haloplasma* são, como os nomes indicam, compostos por bactérias halofílicas (ANTUNES *et al.*, 2008), *Exiguobacterium* é um gênero pertencente à classe Bacillus, e também um membro do filo Firmicutes, foi encontrado em áreas que cobrem uma ampla gama de temperaturas (-12 a 55°C), incluindo as geleiras da Groelândia e fontes termais em Yellowstone, também foi isolado de permafrost na Sibéria. Algumas estirpes, em adição à adaptação térmica, também são halotolerantes, podem crescer dentro de uma ampla faixa de valores de pH (5-11) e tolerar níveis elevados de radiação UV (VISHNIVETSKAYA, KATHARIOU, TIEDJE, 2008). O gênero *Marinobacter* já foi descrito em sedimentos de manguezais por Brito *et al.* (2006) na Baía de Guanabara, os autores associaram este gênero como tendo a habilidade de degradar compostos aromáticos leves tais como benzeno, tolueno e xileno. Bactérias do gênero *Erythrobacter* são Gram-negativas, aeróbias e quimorganotróficas e também são halofílicas (SHIBA; SIMIDU, 1982) e o gênero *Pontibacillus* foi primeiramente proposto por Lim *et al.* (2005) e foi definido como contendo bactérias Gram-positivas e moderadamente halofílicas.

Nas análises de similaridade feitas pelo teste PERMDISP, se evidenciou que os manguezais foram todos diferentes entre si, com exceção de Coreaú e Ceará, mostrando que esses manguezais apresentaram microbiotas distintas e características de cada local. Para os microbiologistas, o conceito de isolamento geográfico foi desenvolvido recentemente. Por quase um século, a microbiologia se baseou no paradigma geral de que “tudo está em toda parte e o ambiente seleciona” o que, em outras palavras, significa que a maioria dos táxons têm amplas distribuições biogeográficas e altos níveis de fluxo gênico devido à ampla dispersão que sobrepõe a adaptação local. No entanto, este paradigma está sendo investigado já que ferramentas cada vez mais sensíveis estão sendo mais amplamente utilizadas na ecologia microbiana (LYNCH *et al.*, 2004).

Demergasso *et al.* (2004) usaram bibliotecas de DNAr 16S e DGGE para documentar vários táxons de bactérias e arqueias halofílicas divergentes de lagoas salinas no deserto de Atacama. Em amostras de vales secos da Antártica, 51 grupos de bactérias e arqueias foram descritos como tendo altos níveis de variabilidade local e forte divergência de táxons conhecidos. Whitaker *et al.* (2003) documentaram fortes estruturas biogeográficas em arqueias hipertermofílicas da Islândia, da América do Norte e leste da Ásia. Outro exemplo vem de um estudo global de RNAr 16S de cianobactérias que mostraram forte diversificação regional e local. Tais exemplos continuam a se acumular na literatura, com destaque para a crescente compreensão de que o isolamento geográfico é um importante, porém geralmente negligenciado, aspecto na evolução microbiana.

Neste trabalho, no geral, os manguezais estudados apresentaram semelhanças, porém ao se analisar mais profundamente os grupos encontrados e suas abundâncias foi possível perceber que cada manguezal tem uma microbiota distinta provavelmente influenciada pelas características locais, mostrando que cada manguezal abriga uma microbiota única e adaptada às condições particulares de cada área.

A fim de caracterizar os grupos microbianos encontrados somente nos metagenomas de sedimentos de manguezal e de como estes se diferenciavam de outros ambientes, Andreote *et al.* (2012) compararam seu conjunto de dados com uma coleção de metagenomas selecionados de sedimentos estuarinos, águas oceânicas, solos de florestas tropicais, solos cultivados e água de manguezais. Nesta análise, o conjunto de dados completo de sedimentos de manguezal, ou seja dos 4 ambientes dentro dos 2 manguezais analisados pelos autores, foram concatenados a fim de se construir um só conjunto de dados e foram usados como uma amostra que representa o metagenoma de sedimento de manguezal. Os autores fizeram uma análise de componentes principais (PCA) e alcançaram o que consideraram um elevado nível de explicação da variância, com valores de 54,7% para o primeiro eixo e de 18,0% para o segundo eixo. Este resultado mostrou os metagenomas de solos e oceanos se agrupando ao longo do primeiro eixo, enquanto que as amostras de manguezal estão no meio do eixo, o que indica a ocorrência simultânea de grupos encontrada nestes dois grupos (solos e oceano) em manguezais.

O metagenoma de sedimentos de manguezal gerado no estudo de Andreote *et al.* (2012) ficou agrupado mais próximo às amostras de solo, mas a sua fidelidade para outros dados de solo não foi completamente observada no segundo eixo de separação. Neste caso, observa-se a

separação que os de sedimentos de manguezais formam em relação aos outros solos pela alocação da amostra manguezal longe do meio do eixo.

Além da separação de amostras no PCA visualizada por Andreote *et al.* (2012), também foi possível determinar os táxons microbianos com ocorrência diferencial nos ambientes. Ao longo do primeiro eixo, as separações foram com base na ocorrência mais comum de Alphaproteobacteria, Eukaryota, cianobactérias, e Bacteroides em amostras do oceano e Betaproteobacteria, Acidobacteria, Planctomycetes, Deinococcus-Thermus e Bacteroides em solos. Para a separação observada no segundo eixo, os táxons microbianos envolvidos foram o Actinobacteria (encontrada principalmente em sedimentos de estuários), Gammaproteobacteria e Archaea (mais comumente ocorrem no conjunto de dados de água de manguezais) e Synergistetes, Thermotogae, espiroquetas e Delta/Epsilonproteobacteria em sedimentos de manguezais. Este resultado vincula a alta ocorrência de Deltaproteobacteria com os nichos disponíveis para a colonização microbiana em sedimentos de manguezal, tornando este grupo um candidato para avaliação mais aprofundada em futuros estudos de microbiologia de manguezais. Percebe-se então que em níveis taxonômicos mais altos e em escala de ecossistemas, a microbiota presente nos sedimentos de manguezais é bem semelhante.

O par de iniciadores utilizados neste trabalho para amplificar a região V4 do RNAr 16S (515f e 806r) é ideal para analisar as comunidades de bactérias como também as de arqueias. As sequências que foram classificadas como arqueias, que representaram em média 3,4% do total, foram analisadas separadamente para também se ter acesso à diversidade taxonômica deste domínio nos sedimentos de manguezais estudados.

Bates *et al.* (2011) estudando arqueias em 150 amostras de solos desde vales secos da Antártica até florestas tropicais da América do Sul usando o mesmo par de iniciadores, encontraram uma média de 2% de sequências de arqueias nos seus dados. Os autores acharam somente dois filos, Crenarchaeota e Euryarchaeota, sendo o primeiro mais abundante em todas as amostras, tal como foi encontrado neste trabalho.

O manguezal do Ceará apresentou três gêneros exclusivos a ele, *Halobacterium*, *Natronococcus* e *Thermogymnomonas*. Os dois primeiros gêneros se referem a arqueias que já foram encontradas em ambientes hipersalinos como lagos salinos e salinas (NORTON; MCGENITY; GRANT, 1993). Já o último, se refere a uma arqueia termoacidofílica (ITOH; YOSHIKAWA; TAKASHINA, 2007).

Só houve um gênero de Archaea que foi significativamente mais abundante nos manguezais e pontos analisados, o gênero *Candidatus Nitrososphaera* (TABELA 3.6), o qual foi encontrado em maior abundância no ponto 3 do Acaraú. Trata-se de uma arqueia oxidadora de amônio (AOA) termofílica, previamente isolada de fontes termais (SPANG *et al.*, 2012).

Até recentemente, acreditava-se que a microbiologia da oxidação da amônia estava bem entendida, bactérias aeróbicas quimiolitotróficas das classes Beta e Gammaproteobacteria eram os únicos micro-organismos conhecidos como oxidantes de amônia (JARRELL *et al.*, 2011). No entanto, nos últimos anos, esse entendimento teve de ser radicalmente revisto, em primeiro lugar, pela descoberta de que o amônio também poderia ser oxidado por via anaeróbia por um clado de Planctomycetes e, posteriormente, pela descoberta de archaea oxidantes de amônia (AOA), pertencente ao filo Crenarchaeota. Desde então, arqueias oxidadoras de amônio (AOA) superaram bactérias oxidadoras de amônio (AOB) em diversos sistemas terrestres e marinhos, incluindo diferentes solos, o Mar do Norte e o Oceano Atlântico, no Oceano Pacífico e o Mar Negro. Além disso, análises moleculares tem demonstrado que as AOA também ocorrem em associação com esponjas (HATZENPICHLER *et al.*, 2008).

Somente um gênero candidato de arqueia foi detectado nas sequências dos manguezais, o SAGMEG-1, o qual se afilia aos grupos conhecidos de arqueias metanogênicas (TAKAI *et al.*, 2001). Outros gêneros como *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Methanococcus*, *Methanocella*, *Methanogenium*, *Methanolinea*, *Methanosaeta*, *Methanococcoides*, *Methanolobus* e *Methanosarcina* foram encontrados, todos eles de arqueias metanogênicas.

Arqueias metanogênicas são micro-organismos estritamente anaeróbios que produzem metano como resultado da sua respiração anaeróbica (SCHINK, 1997) Para a metanogênese, esse grupo pode utilizar um número limitado de substratos, tais como dióxido de carbono, acetato e compostos contendo um grupo metil sob condições anóxicas (LIU; WHITMAN, 2008). A maior parte das metanogênicas atuam reduzindo o dióxido de carbono para formar metano, o formato também é frequentemente utilizado como o doador de elétrons, em vez de hidrogênio. Algumas das metanogênicas hidrogenotróficas também podem utilizar álcoois tais como o 2-propanol como o doador de elétrons. As arqueias metanogênicas são frequentemente encontradas em ambientes anóxicos, como arrozais, em áreas inundadas, no permafrost, em aterros, subsuperfície

e ruminantes e são conhecidos como as principais fontes de metano para a atmosfera (KEMNITZ *et al.*, 2004).

Quanto à classificação deste grupo, todas as arqueias metanogênicas isoladas e caracterizadas até o momento foram classificadas como sendo pertencentes ao filo Euryarchaeota do domínio Archaea. Este grupo está classificado em 33 gêneros das classes Methanomicrobia, Methanobacteria, Methanococci, Methanopyri. A classe Methanomicrobia é o grupo de metanogênicas mais diversificado geneticamente e fisiologicamente, essa classe está dividida em três ordens (Methanosarcinales, Methanomicrobiales, Methanocellales) e 23 gêneros pertencentes a sete famílias dentro da ordem Methanosarcinales. Os gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta* são conhecidos por desempenhar um papel chave na conversão de acetato em metano em várias ambientes anaeróbios e o resto é conhecido por metabolizar amplas gamas de substratos, como por exemplo hidrogênio, metanol e metilamina. Conhecidos membros da ordem Methanomicrobiales são todos hidrogenotróficos, e alguns deles são frequentemente observadas em ambientes anaeróbicos como importantes captadores de hidrogênio. Os membros da classe Methanobacteria, que compreende as famílias Methanobacteriaceae e Methanothermaceae, são importantes e também têm sido amplamente encontrados em ecossistemas anaeróbios (GARRITY; HOLT, 2001). Methanobacteriaceae compreende quatro gêneros, *Methanobacterium*, *Methanosphaera*, *Methanobrevibacter* e *Methanothermobacter*. A classe Methanococci inclui as famílias Methanococcaceae e Methanocaldococcaceae, que estão amplamente distribuídos em ecossistemas naturais tais como sedimentos marinhos e sedimentos geotérmicos do mar profundo. A classe Methanopyri contém apenas o gênero *Methanopyrus*, uma arqueia metanogênica hipertermofílica isolada de campo hidrotermal em alto-mar (NARIHIRO; SEKIGUCHI, 2011)

Diante do exposto pode-se afirmar que os grupos microbianos encontrados refletem as funções que possivelmente estão sendo desempenhadas nos manguezais. A ocorrência das comunidades de bactérias e arqueias parecem responder às condições ambientais e às pressões encontradas em cada manguezal.

3.5 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho sugerem que, em níveis taxonômicos mais altos, os manguezais apresentam composições semelhantes de filos tanto de bactérias como de arqueias, embora tenha sido evidente a predominância do filo Firmicutes em todos os pontos do Pacoti, o que refletiu na equitatividade menor neste manguezal. A composição da microbiota em níveis taxonômicos mais baixos já revela grandes diferenças entre os manguezais e habitats amostrados. Os índices de diversidade indicaram que impactos estão reduzindo a diversidade das comunidades microbianas, especialmente no Pacoti. A microbiota destes ambientes parece está relacionada com o seu funcionamento, reforçando a importância dessa microbiota única para a manutenção e a sua contribuição para a reconhecida resiliência desses ecossistemas.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas três abordagens usadas neste trabalho, o estudo temporal, o regional e o sequenciamento em larga escala, foi demonstrado que os diversos habitats dentro do manguezal abrigam comunidades microbianas que são modeladas por fatores locais de cada microambiente e que variam ao longo do tempo.

No geral, os micro-organismos presentes nos manguezais parecem ter sua estrutura correlacionada com a composição dos sedimentos, da presença e tipo de vegetação e de fatores ambientais locais, bem como parecem estar sendo alteradas por impactos aos quais os manguezais estão submetidos.

Em termos de composição taxonômica, os mesmos filos de Bacteria e Archaea foram encontrados nos cinco manguezais, porém esses filos compreendem uma diversidade peculiar de gêneros que distingue cada manguezal e cada habitat dentro dos manguezais.

O conjunto de dados ratifica a indissociável relação habitat-micro-organismo e a importância da riqueza e abundância (diversidade) microbiana para a manutenção, funcionamento e resiliência do manguezal.

REFERÊNCIAS

ALONGI, D. M., The fate of bacterial biomass and production in marine benthic food chains. In: HATTORI, T., ISHIDA, Y., MARUYAMA, Y., MOLITA, R. Y., UCHIDA, A. (eds), **Recent Advances in Microbial Ecology**, Japanese Scientific Societies Press, Tokyo, p. 353–359, 1989.

_____. The role of bacteria in nutrient recycling in tropical mangrove and other coastal benthic ecosystems. **Hydrobiologia**, v. 285, p. 19-32, 1994.

_____. Present state and future of the world's mangrove forests. **Environmental Conservation**, v.29, p. 331–349, 2002.

ALONGI, D. M.; CHRISTOFFERSEN, P.; TIRENDI, F. The influence of forest type on microbial-nutrient relationships in tropical mangrove sediments. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 171, p. 201-223, 1993.

ANDREOTE, F. D. *et al.* The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **Plos One**, 7, e38600, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0038600>, 2012.

ANTUNES, A. *et al.* A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brine-filled deep of the Red Sea. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 3580–3587, 2008

ATLAS, R. M.; BARTHA R., **Microbial ecology: fundamentals and applications**. Cummings Science Publishing, 694 p., 1998.

AUGUET, J. C., BARBERAN, A., CASAMAYOR, E. O. Global ecological patterns in uncultured Archaea. **ISME Journal**, v. 4, p. 553–563, 2010.

BALL, M. C. Patterns of secondary succession in a mangrove forest in southern Florida. **Oecologia**, v. 44, p. 226-235, 1980.

BATES, S.T. *et al.* Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **ISME Journal**, v. 18, p. 908-917, 2011.

BINELLI, A. *et al.* Concentration of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in sediment cores of Sundarban mangrove wetland, northeastern part of Bay of Bengal (India). **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 1220-1229, 2007.

BINI, E. Archaeal transformation of metals in the environment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 73, p. 1–16, 2010.

BRITO, E. M. *et al.* Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 752-762, 2006.

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

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

CAO, P. *et al.* Distribution and diversity of archaeal communities in selected Chinese soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80p. 146–158, 2012.

CAPORASO, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, p. 335–336, 2010a.

CAPORASO, J. G. *et al.* PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. **Bioinformatics**, v. 26, 266–267, 2010b.

CAPORASO, J. G. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, p. 1621–1624, 2012.

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.

CARMO, F. L. *et al.* Bacterial Structure and Characterization of Plant Growth Promoting and Oil Degrading Bacteria from the Rhizospheres of Mangrove Plants. **Journal of Microbiology**, v. 49, p. 535–543, 2011.

CARSON, J. K. *et al.* Minerals in soil select distinct bacterial communities in their microhabitats. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, p. 381–388, 2009.

CARSON, J. K. *et al.* Low pore connectivity increases bacterial diversity in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 3936–3942, 2010.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v.40, n.3, p. 735-744, 2010.

CAVALCANTE, R. M. *et al.* The impact of urbanization on tropical mangroves (Fortaleza, Brazil): evidence from PAH distribution in sediments. **Journal of Environmental Management**, v. 91, p. 328-335, 2009.

CHO, J. C.; TIEDJE J. M. Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5448–5456, 2000.

CLARHOLM, M. 1985. Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 17, p. 181–187.

CLARKE, K. R.; GORLEY, R. N. PRIMER v6: User Manual/Tutorial. PRIMER-E, Plymouth, 2006

CLEARY, D. F. R. *et al.* Assessment of Variation in Bacterial Composition among Microhabitats in a Mangrove Environment Using DGGE Fingerprints and Barcoded Pyrosequencing. **Plos One**, v. 7, p. e29380, 2012.

COLARES G. B., MELO V. M. M. Relating microbial community structure and environmental variables in mangrove sediments inside *Rhizophora mangle* L. habitats. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 171–177, 2013.

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.

DELONG, E. F. Archaea in coastal marine environments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 5685–5689, 1992.

DEMERGASSO, C. *et al.* Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, p. 57–69, 2004.

DIAS, A. C. F. *et al.* The bacterial diversity in Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, p. 541-551, 2010.

DIAS A. C. F. *et al.* Archaeal communities in the sediments of three contrasting mangroves. **Journal of Soils and Sediments**, v. 11, p. 1466-1476, 2011.

DIAS, A. C. F. *et al.* Abundance and Genetic Diversity of *nifH* Gene Sequences in Anthropogenically Affected Brazilian Mangrove Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 7960–7967, 2012 .

DUKE, N. C., ALLEN, J. A. *Rhizophora mangle*, *R. samoensis*, *R. racemosa*, *R. Harrisonii* (Atlantic–East Pacific red mangroves). In: ELEVITCH, C.R. Ed., **Species Profiles for Pacific Island Agroforestry**. Permanent Agriculture Resources (PAR), Holualoa, p. 1–18, 2006.

DUKE, N. C.; BALL, M. C.; ELLISON J. C. Factors influencing biodiversity and distributional gradients in mangroves. **Global Ecology and Biogeography Letters**, v. 7, p. 27-47, 1998.

DUKE, N. C. Sustained high levels of foliar herbivory of the mangrove *Rhizophora stylosa* by a moth larva *Doratifera stenosa* (Limacodidae) in north-eastern Australia. **Wetlands Ecology and Management**, v. 10, p. 403-419, 2002.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, p. 2460–2461, 2010.

ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annual Review of Genetics*, v. 26, p. 479-506, 1992.

FEDURCO, M. *et al.* BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 3, p. 22, 2006.

FAO. Forest Resources Assessment Working Paper – 063, FAO: Roma, 2004.

FERRY, J. G. **Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry & genetics**. New York: Chapman & Hall. 536 p., 1993.

FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of sediment bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 626–631, 2006.

FUNCEME. Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. Disponível em: <www.funceme.br>. Acesso em: 21 de janeiro de 2014.

FUNCEME. Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. Disponível em: <www.funceme.br>. Acesso em: 27 de Agosto de 2013.

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.

GHOSH, A. *et al.* Culture independent molecular analysis of bacterial communities in the mangrove sediment of Sundarban, India. **Saline Systems**, v. 6, n. 1, 2010.

GIANI, L. *et al.* Characteristics and methanogenesis of the Balandra lagoon mangrove soils, Baja California Sur, Mexico. **Geoderma**, v. 72, n. 1-2, p. 149-160, 1996.

GILBERT, J. A. *et al.* 2010. Meeting Report. The Terabase Metagenomics Workshop and the Vision of an Earth Microbiome Project. **Standards in Genomic Science**. v. 3, p. 3.

GOMES, N. C. M. *et al.* Dynamics of Fungal Communities in Bulk and Maize Rhizosphere Soil in the Tropics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3758-3766, 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.

GOMES, N. C. M. *et al.* Taking Root: Enduring Effect of Rhizosphere Bacterial Colonization in Mangroves. **Plos One**, v. 5, p. e14065, 2010.

GONZALEZ-ACOSTA, B. *et al.* Seasonal seawater temperature as the major determinant for populations of culturable bacteria in the sediments of an intact mangrove in an arid region. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 55, p. 311–321, 2006.

GREEN, J. L.; BOHANNAN B. J. M.; WHITAKER, R. J. Microbial biogeography: from taxonomy to traits. **Science**, v. 320, p. 1039–1043, 2008.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, 9 pp., 2001.

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

HARTMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. **Plant and Soil**, v. 312, p. 7-14, 2008.

HATZENPICHLER, R. *et al.* A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 2134–2139, 2008.

HERNANDEZ, D. *et al.* De novo bacterial genome sequencing: Millions of very short reads assembled on a desktop computer. **Genome Research**, v. 18, p. 802–809, 2008.

HEYNDRICKX, M. *et al.* Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. **Journal of Microbiological Methods**, v. 26, p. 247–259, 1996.

HIRSCH, A. M. *et al.* Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. **Ecology**, v. 84, p. 858–868, 2003.

HOLGUIN, G.; BASHAN, Y. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, p. 1651-1660, 1996.

HOLGUIN, G. *et al.* La Microbiologia de los manglares. Bosques en la frontera entre el mar y la tierra. **Ciencia Desarrollo**, v. 144, p. 26-35, 1999.

HOLGUIN, G.; GUZMAN, M.A.; BASHAN, Y. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 101, p. 207-216, 1992.

_____. 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.

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

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 27 de Agosto de 2013.

IKENAGA, M. *et al.* Changes in community structure of sediment bacteria along the Florida coastal everglades marsh-mangrove-seagrass salinity gradient. **Microbial Ecology**, v. 59, p. 284–295, 2009.

ITOH, T.; YOSHIKAWA, N.; TAKASHINA, T. *Thermogymnomonas acidicola* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic, cell wall-less archaeon in the order Thermoplasmatales, isolated from a solfataric soil in Hakone, Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2557–2561, 2007.

JACKSON, C. R.; WEEKS, A. Q. Influence of particle size on bacterial community structure in aquatic sediments as revealed by 16S RNAr gene sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 5237–5240, 2008.

JARRELL, K. F. *et al.* Major players on the microbial stage: why archaea are important. **Microbiology**, v. 157, p. 919–936, 2011.

JETTEN, M. S. M. *et al.* The anaerobic oxidation of ammonium. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, p. 421–437, 1999.

JONES, R. T. *et al.* A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. **ISME Journal**. v. 4, p. 442–453, 2009.

KATHIRESAN, K. Importance of Mangrove Ecosystem. **International Journal of Marine Science**, v. 2, n. 10, p. 70-89, 2012.

KEMNITZ, D. *et al.* Community analysis of methanogenic archaea within a riparian flooding gradient. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 449-461, 2004.

KLINDWORTH, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, 2012.

KRISTENSEN, E. *et al.* Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: A review. **Aquatic Botany**, v. 89, n. 2, p. 201-219, 2008.

KÖNNEKE, M. *et al.* Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, v. 437, p. 543–546, 2005.

LACERDA, L.D. **Mangroves Ecosystems: Function and Management**. Springer Verlag, Berlin, 342 p., 2002.

LACERDA, L. D.; MENEZES, M. O. T., MOLISANI, M. M. Changes in mangrove extension at the Pacoti River estuary, CE, NE Brazil due to regional environmental changes between 1958 and 2004. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 1-6, 2007.

LACERDA, L. D. *et al.* Estimating the importance of natural and anthropogenic sources on N and P emission to estuaries along the Ceará State Coast NE Brazil. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 141, p. 149–164, 2008.

LAUBER, C. L. *et al.* Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community composition at the continental scale. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p. 5111–5120, 2009.

LI, M. *et al.* Spatial distribution and abundances of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in mangrove sediments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1243–1254, 2011

LIANG, J. B. *et al.* Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. **Marine Biology**, v. 150, p. 739–747, 2007.

LIM J. M. *et al.* *Pontibacillus chungwhensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic Gram-positive bacterium from a solar saltern in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 165-170, 2005.

LIPSON, D. A.; SCHADT, C. W.; SCHMIDT, S. K. Changes in microbial community structure and function in an alpine dry meadow following spring snow melt. **Microbial Ecology**, v. 43, p. 307–314, 2002.

LIPSON, D. A.; SCHMIDT, S. K. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado Rocky Mountains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2867–2879, 2004.

LIU, W. T. *et al.* Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S RNAr. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4516–4522, 1997.

LIU, Y.C., WHITMAN, W.B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, p. 171–189, 2008.

LOZUPONE, C.A.; KNIGHT, R. Global patterns in bacterial diversity. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 104, p. 11436–11440, 2007.

LUGO, A. E. Mangrove ecosystems: successional or steady state? **Biotropica**, v. 12, p. 65-73, 1980.

LYIMO, T. J., POL, A.; DEN-CAMP, H. J. M. O. Sulfate reduction and methanogenesis in sediments of Mtoni mangrove forest, Tanzania. **AMBIO**, v. 31, n. 7-8, p. 614-616, 2002.

LYNCH, J. M. *et al.* Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. **Biology and Fertility of Soils**, v. 40, p. 363–385, 2004.

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, 1969.

MACRAE, A.; COELHO, R. R. R.; PEIXOTO, R.; ROSADO, A. S. Tropical Soil Microbial Communities. **The Prokaryotes**, p. 85-95, 2013

MADIGAN, M. T. *et al.* **Brock Biology of Microorganisms**, 13. ed, Pearson Benjamin-Cummings, São Francisco, 2010.

MARTINY, J. B. H. *et al.* Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 102–112, 2006.

MENDELSSOHN, I. A., MCKEE, K. L. Saltmarshes and mangroves. In BARBOUR, M.; BILLINGS, W. D. ed., **North American Terrestrial Vegetation**, Cambridge University Press, Cambridge, 2. ed. p. 501-536, 2000.

MENDES L. W. *et al.* Shifts in phylogenetic diversity of archaeal communities in mangrove sediments at different sites and depths in southeastern Brazil. **Research in Microbiology**, v. 392, p. 366-377, 2012.

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.

MENDES, L. W. *et al.* Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **ISME Journal**, v. 1, p. 1, 2014.

MEULEPAS, R. J. W. *et al.* Effect of methanogenic substrates on anaerobic oxidation of methane and sulfate reduction by an anaerobic methanotrophic enrichment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1499-1506, 2010.

MEYER, O. Functional groups of microorganisms. In SCHULZE, E.; MOONEY, H. ed. **Biodiversity and ecosystem function**. Springer-Verlag, New York, New York, USA, p. 67–96, 1994.

MOORE, J. C. *et al.* Top-down is bottom-up: does predation in the rhizosphere regulate aboveground dynamics? **Ecology**, v. 84, p.846–857, 2003.

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 RNAr. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695–700, 1993.

NARIHIRO T.; SEKIGUCHI Y. Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea. **Microbial Biotechnology**, v. 4, p. 585–602, 2011.

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

NEDWELL, D. B., BLACKBURN, T. H., WIEBE, W. J. Dynamic nature of the turnover of organic carbon, nitrogen and sulphur in the sediments of a Jamaican mangrove forest. **Marine Ecology Progress Series**, v. 110, p. 223–231, 1994.

NILIN, J. *et al.* Sediment quality assessment in a tropical estuary: The case of Ceará River, Northeastern Brazil. **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 89-86, 2013.

NOGUEIRA, V. L. R. Acesso a diversidade e função microbiana de solos do manguezal do Rio Jaguaribe (Fortim-CE) por métodos dependentes de cultivo e metagenômica. **Tese de doutorado – Universidade Federal do Ceará**, 175 p., 2011.

NOGUEZ, A. M. *et al.* Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest. **Global Ecology and Biogeography**, v. 14: p. 241–248, 2005.

NORTON, C. F.; MCGENITY T. J.; GRANT W. D. Archaeal halophiles (halobacteria) from two British salt mines. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 1077-1081, 1993.

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.

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

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

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 RNAr. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3367–3373, 1997.

PACE, N. R.; OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA Phylogeny and the Primary Lines of Evolutionary Descent. **Cell**, v. 45, p. 325-326, 1986.

PASTERNAK, Z. *et al.* Spatial and Temporal Biogeography of Soil Microbial Communities in Arid and Semiarid Regions. **Plos One**, doi:10.1371/journal.pone.0069705, 2013.

PEIXOTO, R. *et al.* Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 9, p. 341–354, 2011.

PEREIRA E SILVA, M. C. *et al.* Spatial and Temporal Variation of Archaeal, Bacterial and Fungal Communities in Agricultural Soils. **Plos One** 7(12): e51554, 2012.

PRASAD, M. B. K.; RAMANATHAN, A. L. Sedimentary nutrient dynamics in a tropical estuarine mangrove ecosystem. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 80, p. 60–66, 2008.

PROSSER, J. I. *et al.* The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 384-392, 2007.

PUREZA, L. M. S. *et al.* Bacterial Diversity in an Amazonian Mangrove Ecosystem. **Aquatic Science and Technology**, v. 1, n. 1, 2013.

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

RAMETTE, A.; TIEDJE, J. M.; BOETIUS, A. Impact of space, time and complex environments on microbial communities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 60-62, 2009.

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.

RIBEIRO, C. G. *et al.* ARDRA profiles of bacteria and archaea in mangrove sediments with different levels of contamination in the estuarine complex of Paranaguá, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, v. 56, p. 275-281, 2013.

RIGONATO, J. *et al.* Drivers of cyanobacterial diversity and community composition in mangrove soils in south-east Brazil. **Environmental Microbiology**, v. 15, p. 1103–1114, 2013.

RIVERA-MONROY, V. H. *et al.* Flux of nitrogen and sediment in a fringe Mangrove forest in Terminos Lagoon, Mexico. **Estuarine, Coastal And Shelf Science**, v. 40, p. 139-160, 1995.

ROBERTSON, C. E. *et al.* Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 638–642, 2005.

ROCHA, L. L. Diversidade taxonômica e funcional da microbiota de solos do manguezal do rio Cocó (Fortaleza-CE) e seleção de cepas produtoras de enzimas com potencial para aplicação industrial. **Tese de Doutorado – Universidade Federal do Ceará**, 171 p., 2012.

SAHA, M. *et al.* Distribution of metals in representative biota of sundarban mangrove wetland, northeast India. **Bull. Environ. Contam. Toxicology**, v. 76, p. 656-662, 2006.

SANDAA, R. A.; ENGER, O., TORSVIK, V. Abundance and diversity of Archaea in heavy-metal contaminated soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3293–3297, 1999.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 94, p. 441–448, 1975.

SANTOS, H. F. *et al.* Mangrove Bacterial Diversity and the Impact of Oil Contamination Revealed by Pyrosequencing: Bacterial Proxies for Oil Pollution. **Plos One**, v. 6, n. 3, p. e16943, 2011.

SAULNIER, D. *et al.* Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture**, v. 191, p. 133–144, 2000.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G. Manguezais brasileiros: uma síntese sobre aspectos históricos (séculos XVI a XIX), zonação, estrutura e impactos ambientais. In: **Anais do Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira. Subsídios a um gerenciamento ambiental**. São Paulo, ACIESP, v. I, p. 333-341, 1994.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. São Paulo, Caribbean **Ecological Research**, p. 7, 1995.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. *et al.* Variability of mangrove ecosystems along the brazilian coast. **Estuaries**, v.13, p.204-218, 1990.

SCHIMEL, J.; BALSER T. C.; WALLENSTEIN, M. Microbial Stress-Response Physiology and its Implications for Ecosystem Function. **Ecology**, v. 88, p. 1386–1394, 2007.

SCHINK, B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 262–280, 1997.

SCHLEPER, C. Ammonia oxidation: different niches for bacteria and archaea? **ISME Journal**, v. 4, p. 1092–1094, 2010.

SCHLEPER, C.; NICOL, G. W. Ammonia-oxidising archaea-physiology, ecology and evolution. **Advances in Microbial Physiology**, v. 57, p. 1-47, 2010.

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

SCHULTE, E. E.; HOPKINS, B. G. Estimation of soil organic matter by weight loss-onignition. 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 RNAr Gene-Based Microbial Community Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4870-4876, 1998.

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.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, n.10, p.1135-1145, 2008.

SHEPARD, F.P. Nomenclature based on sand-silt-clay ratios. **Journal of Sedimentary Petrology**, v. 24, p. 151-158, 1954.

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

SHIBA T.; SIMIDU, U. *Erythrobacter longus* gen. nov., sp. nov., an Aerobic Bacterium Which Contains Bacteriochlorophyll a. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, p. 211-217, 1982.

SINGH, B. K. *et al.* Unravelling rhizosphere–microbial interactions: opportunities and limitations. **Trends in Microbiology**, v.12, 2004.

SINGH, S. K. *et al.* Phylogenetic diversity of archaeal 16S RNAr and ammonia monooxygenase genes from tropical estuarine sediments on the central west coast of India. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 177–186, 2010.

SMALLA, K. *et al.* Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant-Dependent Enrichment and Seasonal Shifts Revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4742–4751, 2001.

SMITH, C. J.; OSBORN, A. M. Advantages and limitations of quantitative PCR (qPCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, p. 6–20, 2009.

SMITH, T. J. III; DUKE, N. C. Physical determinants of inter estuary variation in mangrove species richness around the tropical coastline of Australia. **Journal of Biogeography**, v. 14, p. 9–19, 1987.

SOUSA, O. V. *et al.* The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceara, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 1725–1734, 2006.

SPALDING, M.; KAINUMA M.; COLLINS L. **World Atlas of Mangroves**. Earthscan: Londres, 2010.

SPANG, A. *et al.* The genome of the ammonia-oxidizing *Candidatus Nitrososphaera gargensis*: insights into metabolic versatility and environmental adaptations. **Environmental Microbiology**, v. 14, p. 3122–3145, 2012.

TAKAI, K. *et al.* Archaeal Diversity in Waters from Deep South African Gold Mines, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5750–5760, 2001.

TAKETANI, R. G. *et al.* Characterisation of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 343–354, 2009.

TAKETANI R. G.; TSAI S. M. The influence of different land uses on the structure of archaeal communities in Amazonian Anthrosols based on 16S RNAr and amoA genes. **Microbial Ecology**, v. 59, p. 734–743, 2010.

TATE, R. **Soil microbiology**. John Wiley and Sons, New York, New York, USA, 2. ed, 2000.

THATOI, H. *et al.* Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 1–19, 2013.

THOMPSON, F. L. *et al.* Biodiversity of Vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 68, p. 403–431, 2004.

TIEDJE, J. M. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In ZEHNDER, A. J. B. ed. **Environmental Microbiology of Anaerobes**. John Wiley and Sons, N.Y. p. 179-244, 1988.

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

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.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity: magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 296, p. 1064–1066, 2002.

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.

TOURNA, M. *et al.* Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 1357–1364, 2008.

TURCATTI, G. *et al.* A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. **Nucleic acids research**, v. 36, p. 25, 2008.

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

VAN ELSAS, J. D.; BOERSMA, F. G. H. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 77-87, 2011.

VARON-LOPEZ, M. *et al.* Sulphur-oxidizing and sulphate-reducing communities in Brazilian mangrove sediments. **Environmental Microbiology**, v. 16, p. 845–855, 2014.

VETRIANI, C. *et al.* Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4375–4384, 1999.

VISHNIVETSKAYA, T. A.; KATHARIOU, S.; TIEDJE, J. M. The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. **Extremophiles**, v. 13, p. 541-555, 2009.

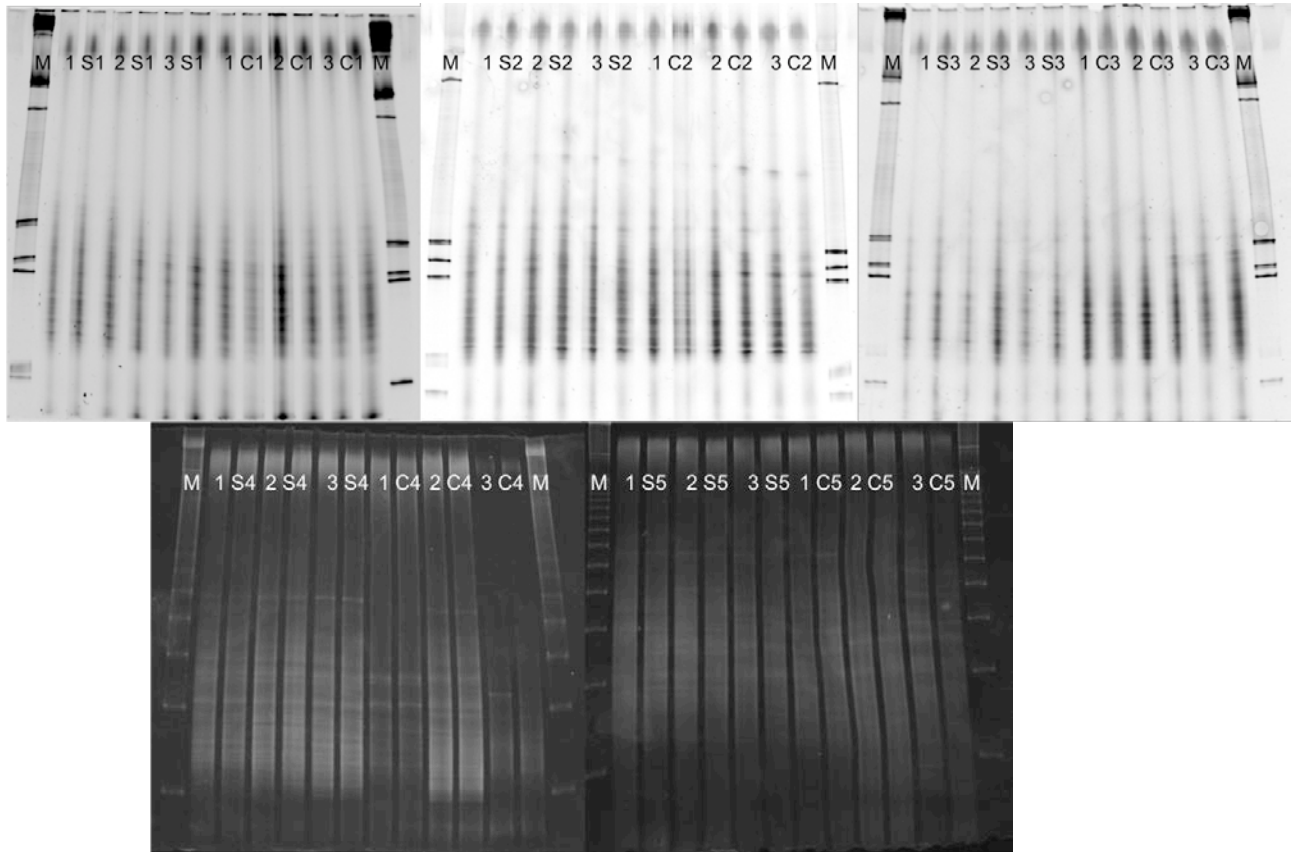
WALSH, D. A.; PAPKE, R. T.; DOOLITTLE, W. F. Archaeal diversity along a soil salinity gradient prone to disturbance. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 1655–1666, 2005.

WHITAKER, R. J.; GROGAN, D. W.; TAYLOR, J. W. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. **Science**, v. 301, p. 976–978, 2003.

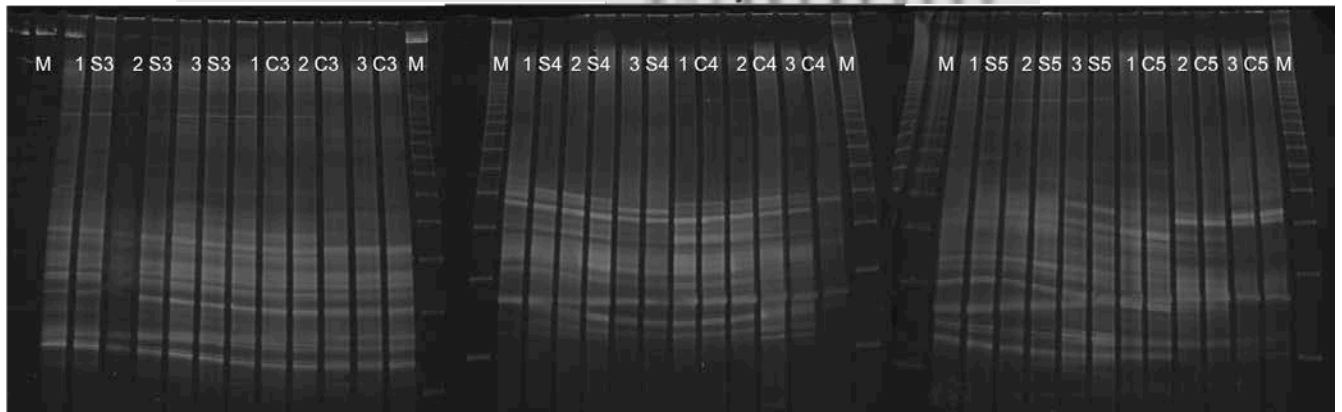
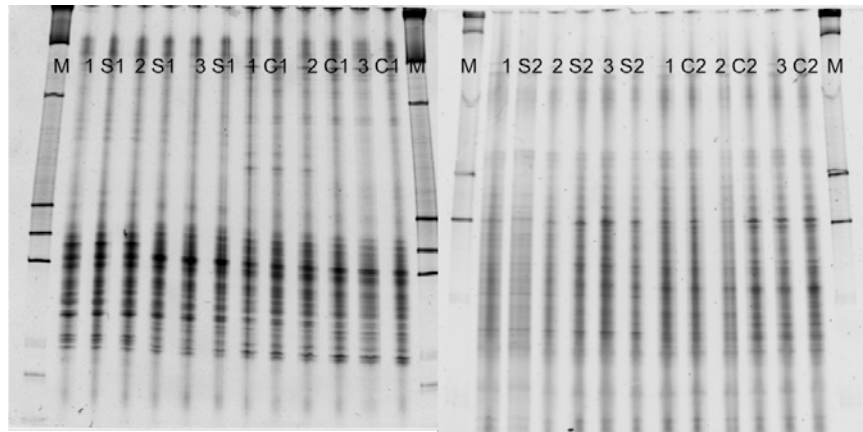
WOESE C. R.; KANDLER O.; WHEELIS M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 4576–4579, 1990.

APÊNDICES

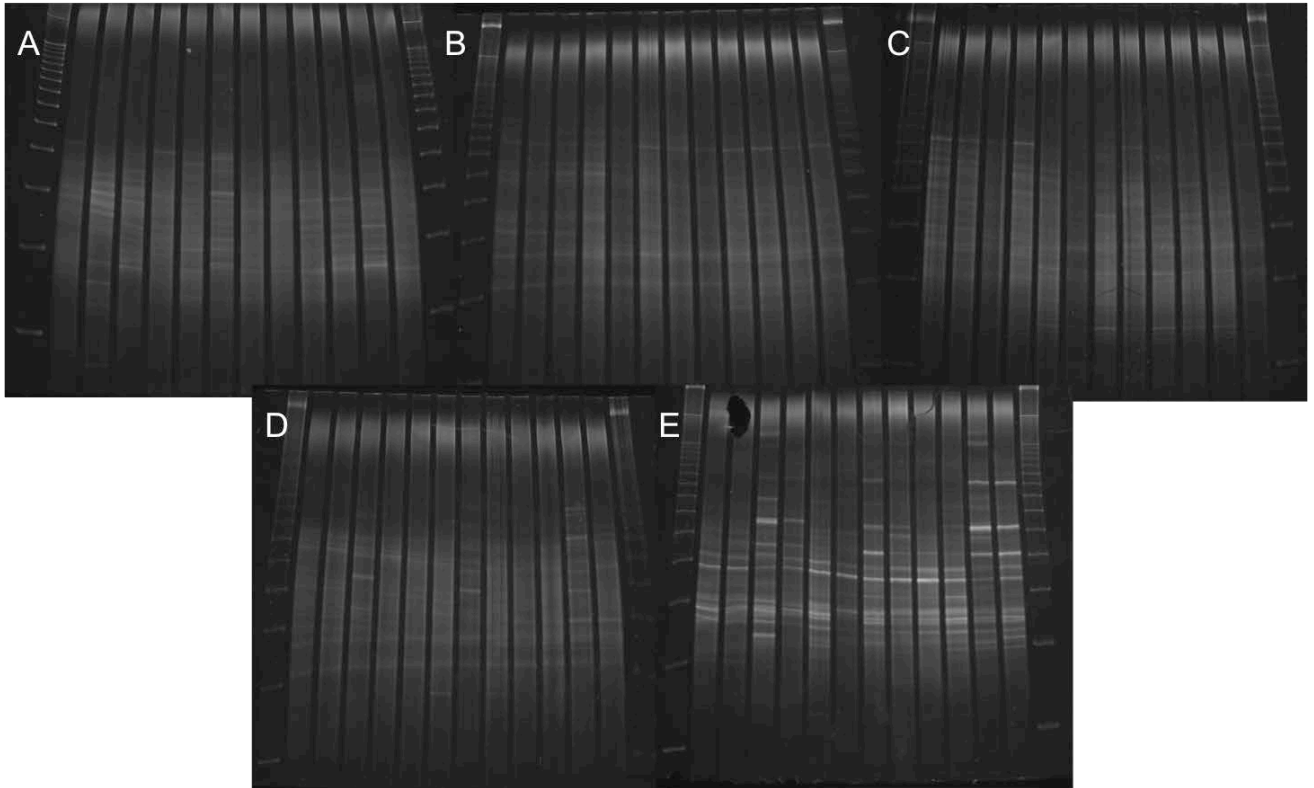
APÊNDICE A – Géis de DGGE de Bacteria dos 5 anos de monitoramento. As amostras estão dispostas em duplicatas. M – Marcador.



APÊNDICE B– Géis de DGGE de Archaea dos 5 anos de monitoramento. As amostras estão dispostas em duplicatas. M – Marcador.



APÊNDICE C – Géis de DGGE de Bactéria dos 5 manguezais do estado do Ceará. As amostras estão dispostas em todos os géis na seguinte ordem: Marcador, 1 C1, 1 S1, 1 C2, 1 S2, 2 C1, 2 S1, 2 C2, 2 S2, 3 C1, 3 S1, 3 C2, 3 S2, Marcador. A – Pacoti, B – Ceará, C – Acaraú, D – Coreaú e E – Timonha.



APÊNDICE D – Géis de DGGE de Archaea dos 5 manguezais do estado do Ceará. As amostras estão dispostas em todos os géis na seguinte ordem: 1 C1, 1 S1, 1 C2, 1 S2, 2 C1, 2 S1, 2 C2, 2 S2, 3 C1, 3 S1, 3 C2 e 3 S2. A – Pacoti, B – Ceará, C – Acaraú, D – Coreaú e E – Timonha.

