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

Diversidade de Cianobactérias em Manguezais do Estado de São Paulo

Janaina Rigonato

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

**Piracicaba
2010**

Janaina Rigonato
Bióloga

Diversidade de Cianobactérias em Manguezais do Estado de São Paulo

Orientadora:
Profª. Dra. **MARLI DE FÁTIMA FIORE**

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

**Piracicaba
2010**

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

Rigonato, Janaina

Diversidade de cianobactérias em manguezais do Estado de São Paulo / Janaina

Rigonato. - - Piracicaba, 2010.

107 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Bactérias 2. Biodiversidade 3. Ecossistemas de mangue 4. Fixação de Nitrogênio
Título

CDD 589.46
R572d

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

AGRADECIMENTOS

Durante este período de minha vida tenho muito a agradecer:

À Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore, pela orientação e confiança depositada em mim neste período;

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola (ESALQ/USP), pela oportunidade;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao CNPq pelas bolsas de estudo;

Ao técnico da Embrapa Meio Ambiente, João Silva, e a todos que participaram e se empenharam nas expedições de coleta, as quais foram fundamentais para a realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Angela Kent da Universidade de Illinois, e a todos do laboratório, pela oportunidade de estágio oferecida;

Ao doutorando Raphael Moreira Beirigo, por realizar as análises químicas do solo;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias (CENA-USP), Ana Paula Dini, Carol Hoff, Carol Pamplona, Danillo Alvarenga, Diego Genuário, Elaine Crespim, Estela Stenico, Luciana Mecatti, Natália Nardelli, Tânia Shishido, Marina Gumieri pelo companheirismo, momentos de descontração e pelos dias de trabalho compartilhados, em especial a Adriana Lorenzi pelas sugestões;

À minha família, pai Sergio, mãe Isabel e irmão Junior, por todo o amor e por serem peças fundamentais na minha existência;

Ao Bruno, por estar sempre ao meu lado aonde quer que eu vá;

À minha segunda família, Gilvan, Lilia e CIA por todo carinho a mim oferecidos durante nossa convivência;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo,

A Deus, especialmente agradeço;

“Suas obras são perfeitas, porque todos os Seus caminhos são justos”.

Muito obrigada!

“Renda-se, como eu me rendi.
Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei.
Não se preocupe em entender,
viver ultrapassa qualquer entendimento”.

Clarice Lispector

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 DESENVOLVIMENTO	15
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1.1 Biodiversidade.....	15
2.1.2 Manguezais	15
2.1.3 Contaminação do mangue por petróleo.....	17
2.1.4 Ilha do Cardoso/Cananéia e Bertioga.....	18
2.1.5 Micro-organismos do mangue	19
2.1.6 Estudos realizados para avaliação da microbiota nos manguezais de Ilha do Cardoso e Bertioga....	20
2.1.7 Cianobactérias	22
2.1.8 Métodos Moleculares	25
2.1.8.1 DGGE.....	27
2.1.8.2 Biblioteca genômica.....	28
2.1.8.3 ARISA.....	28
2.1.8.4 TRFLP	29
2.1.8.5 Análise estatística	31
2.2 Objetivos e perguntas biológicas.....	32
2.3 Material e métodos.....	33
2.3.1 Descrição do local de coleta.....	33
2.3.2 Amostragem de Folhas e extração de DNA:	34
2.3.3 Amostragem de Solos e extração de DNA:.....	36
2.3.4 Análises químicas do solo	37
2.3.5 Amplificação por PCR do gene 16S RNAr.....	38

2.3.6 DGGE	38
2.3.7 Análise estatística do DGGE	39
2.3.8 Sequenciamento das bandas de DGGE de folhas	39
2.3.9 Construção da biblioteca genômica	40
2.3.10 Sequenciamento da biblioteca genômica de amostras de DNA de folhas.	41
2.3.11 Sequenciamento da biblioteca genômica de amostras de DNA de solos.	42
2.3.12 Análises das sequências, definição de UTO e construção da árvore filogenética.	42
2.3.13 Índices de riqueza, diversidade e curvas de rarefação	43
2.3.14 ARISA	43
2.3.15 Análise dos dados de ARISA	45
2.3.16 TRFLP	46
2.3.17 Análise dos dados de TRFLP	47
2.4 Resultados e Discussão.....	48
2.4.1 Diversidade de Cianobactérias na filosfera	48
2.4.2 Diversidade de Cianobactérias de solos dos manguezais	61
2.4.2.1 DGGE e Biblioteca do gene 16S RNAr	61
2.4.2.2 ARISA e TRFLP do gene <i>nifH</i>	74
3 Considerações Finais	84
REFERÊNCIAS	87

RESUMO

Diversidade de cianobactérias em manguezais do Estado de São Paulo.

Os micro-organismos desempenham importante papel na reciclagem dos elementos em ecossistemas de manguezais, uma vez que como produtores primários podem controlar reações químicas. O grupo particular das cianobactérias atua promovendo a entrada de carbono e nitrogênio por meio da sua capacidade de realizar fotossíntese oxigênica e fixação de nitrogênio atmosférico. No Brasil, as florestas de manguezais ocupam uma área de aproximadamente 25.000 km² e no Estado de São Paulo, 240 km² da área total está coberta por este ecossistema. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de cianobactérias que colonizam as folhas de *Avicennia schaueriana*, *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* do manguezal da Ilha do Cardoso, um ambiente pristino, bem como acessar e comparar a população de cianobactérias dos solos dos manguezais da Ilha do Cardoso e de Bertioga, este último contaminado com óleo bruto. Para este propósito, as técnicas de DGGE e biblioteca de clone do gene RNAr 16S, ARISA e TRFLP do gene *nifH* foram utilizadas. Os resultados da filossfera evidenciaram uma sutil influência do gênero de árvore na colonização das cianobactérias, entretanto, um forte efeito da localização destas dentro do manguezal foi observado. As folhas das árvores do meio da área de manguezal apresentaram uma maior diversidade de gêneros de cianobactérias. No geral, foram identificados 19 gêneros e várias sequências de cianobactérias não cultiváveis. Uma predominância de sequências com alta similaridade com representantes das ordens Nostocales e Oscillatoriales foi observada. Sequências com identidade com o gênero *Symphyonemopsis* (ordem Stigonematales) foram recuperadas em maiores quantidade. Com relação à diversidade no solo, os resultados de DGGE e ARISA demonstraram que a população de cianobactérias é distinta entre os manguezais estudados, porém os perfis eletroforéticos das amostras coletadas próximo ao mar se agruparam, sugerindo que a colonização é influenciada pelas condições de inundação. O perfil mais diferente foi obtido no ponto próximo à floresta no manguezal de Bertioga, local mais afetado pela contaminação de óleo. As bibliotecas de clones claramente indicaram diferenças das sequências do gene RNAr 16S entre os pontos amostrados. Um total de 99 UTOs foi obtido, com 61 “singletons”. Na localidade próxima ao mar os gêneros *Prochlorococcus* e *Synechococcus* foram dominantes em ambos os manguezais. A maioria das sequências de RNAr 16S encontradas nos outros pontos foram relacionadas com cianobactérias não cultiváveis. A diversidade alfa sugeriu que o local com menor diversidade foi o meio do manguezal de Bertioga, e o maior foi em Bertioga próximo à floresta, os demais pontos tiveram valores similares. Os maiores índices de riqueza foram encontrados nos pontos próximos à floresta, enquanto menores valores foram observados nos pontos próximos ao mar. A maioria das sequências de RNAr 16S obtidas em Bertioga no meio do manguezal e próximo à floresta tiveram identidades menores do que 90% com as disponíveis no GenBank. Estas sequências podem representar novos táxons ou cianobactérias conhecidas, porém ainda não sequenciadas. O TRFLP do gene *nifH* indicou que os locais próximos ao mar e meio do manguezal na Ilha do Cardoso abrigaram populações de diazotróficos semelhantes, enquanto que em Bertioga estes pontos apresentaram diferenças nos perfis de TRFLP. As maiores diferenças estavam nos locais próximos à floresta em ambos os manguezais.

Palavras chave: RNAr 16S; DGGE; Biblioteca de clones; ARISA; TRFLP; Diazotróficos; Diversidade genética

ABSTRACT

Cyanobacterial diversity from São Paulo State mangroves

Microorganisms play important role in the recycling of elements in mangrove ecosystems, since as primary producers they can control chemical reactions. The particular cyanobacteria group act promoting the input of carbon and nitrogen through their ability to realize oxygenic photosynthesis and fixing atmospheric nitrogen. In Brazil, the mangrove forests occupy an area of approximately 25.000 km², and in the total area of São Paulo State, 240 km² are covered by this ecosystem. The aim of this work was to evaluate the cyanobacterial diversity that colonize *Avicennia schaueriana*, *Rhizophora mangle* and *Laguncularia racemosa* leaves from Cardoso Island mangrove, a pristine site, as well as to assess and compare the soil cyanobacterial population from both Cardoso Island and Bertioga mangroves, this last one contaminated with crude oil. For this purpose, the techniques of DGGE and clone library of 16S rRNA gene, ARISA, and TRFLP of *nifH* gene were used. The phyllosphere results evidenced a subtle difference of the genus of tree on the colonization of cyanobacteria, however a strong effect from tree's location within the mangrove was observed. The tree leaves from the middle of mangrove area showed a greater diversity of cyanobacterial genera. In geral, 19 genera and several uncultivated cyanobacteria were identified. A predominance of sequences with high similarities to representatives of the order Nostocales and Oscillatoriales were observed. Sequences with similarities to the genus *Symphyonemopsis* (order Stigonematales) were recovered in higher quantity. Regarding to the soil diversity, DGGE and ARISA results showed that the cyanobacterial population is distinct among both mangroves studied, however the electrophoretic profiles from samples collected near to the sea grouped together, suggesting that colonization is influenced by flood conditions. The most different profile was obtained in the site near to the forest in Bertioga mangrove, location more affected by the oil contamination. Clone libraries clearly showed 16S rRNA sequences differences among sites sampled. A total of 99 OTUs were obtained, with 61 singletons. In the site near to the sea the *Prochlorococcus* and *Synechococcus* genera were dominant in both mangroves. The majority of 16S rRNA sequences found in the other sites were related to uncultured cyanobacteria. Alpha diversity suggested that the site with lowest diversity was middle of the Bertioga mangrove, and the highest was Bertioga near to the forest, the remainder sites had similar values. The highest richness indices were found in the sites near to the forest, while lower values were observed in the sites near to the sea. The majority of the 16S rRNA sequences obtained from the middle of the mangrove and near to the forest in Bertioga showed identities lower than 90% with that available in the GenBank. These sequences may represent novel cyanobacterial taxa or known cyanobacteria not yet sequenced. The TRFLP of *nifH* gene indicated that the sites near to the sea and middle of the Cardoso Island mangrove harbored similar diazotrophic populations, while in Bertioga these sites presented differences in TRFLP profiles. The greatest differences were in the sites near to the forest in both mangroves.

Keywords: 16S rRNA; DGGE; Clone Library; ARISA; TRFLP; Diazotrophic; Genetic diversity

1 INTRODUÇÃO

O manguezal é considerado um ecossistema costeiro de transição entre os ambientes terrestres e marinhos, comumente encontrado nas regiões tropicais e subtropicais e sempre sob forte efeito das marés. Este ambiente é dominado por espécies vegetais típicas, e apresenta elevada taxa de produção primária e secundária. Os manguezais são fonte de energia para muitas lagoas costeiras e servem como berçário para muitas espécies do nécton. Apesar de sua grande importância econômica, pois tem demonstrado sustentar mais de 70 atividades humanas, desde coleta de madeira até a pesca, este ambiente não tem escapado da destruição massiva causada pela poluição e degradação antrópica. No Brasil os manguezais são encontrados desde o extremo norte até o estado de Santa Catarina, sendo que o estado de São Paulo possui uma área de 240 Km² de mangue. Os manguezais presentes na Baixada Santista, representado pelo município de Bertioga e no litoral sul do Estado, no município de Cananéia, fazem parte deste estudo.

Apesar de apresentar uma elevada taxa de produção primária, o manguezal é extremamente deficiente em nutrientes como nitrogênio e fósforo, de maneira que estes compostos são, em sua maioria, fornecidos pelos micro-organismos presentes no sedimento, na água e associados às plantas. Dentre o grupo das bactérias destacam-se as cianobactérias, por serem os únicos organismos capazes de realizar ambos os processos metabólicos de fixação de carbono (pela fotossíntese) e de nitrogênio (pela fixação biológica do nitrogênio). Desta maneira, este grupo tem crucial importância para o aporte destes nutrientes nesse ecossistema.

Para acessar a micro-biota de amostras ambientais técnicas independentes de cultivos são extremamente valiosas, uma vez que, em sua maioria os micro-organismos não são cultiváveis. Para conhecer os integrantes presentes no ambiente avaliado foram utilizadas metodologias que avaliam o gene rDNA 16S, pois este gene é conservado entre as diversas espécies, e ainda o banco de dados disponível nos permite fazer inferências a respeito de quais espécies estão presentes nos ambientes. Também é de grande importância se avaliar genes funcionais, como *nifH*, que codifica uma proteína parte do conjunto de enzimas responsáveis pela fixação biológica do nitrogênio, afim de se discutir a atividade funcional das cianobactérias nos manguezais.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Biodiversidade

A palavra biodiversidade é uma forma abreviada de se referir à diversidade biológica. Na última década este termo foi amplamente colocado em evidência, especialmente após a declaração da Agenda XXI, publicada depois da Reunião da Eco-92, no Rio de Janeiro em 1992. Uma das definições mais úteis de biodiversidade é dada pela União Internacional para Conservação da Natureza e Recursos Naturais: “biodiversidade envolve todas as formas de vida, ecossistemas e processos ecológicos, e abrange a sua hierarquia em níveis genético, taxonômico e de ecossistema” (MCNEELY et al., citados por BULL; GOODFELLOW; SLATER, 1992). No conhecimento da biodiversidade presente nos diferentes ecossistemas está a base do progresso biotecnológico esperado em diferentes áreas da ciência aplicada (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999).

Neste contexto pode-se citar a importância dos manguezais, por serem ecossistemas litorâneos caracterizados como detentor de uma grande diversidade de espécies, apresentando um papel crucial na manutenção destes organismos e também pela sua alta produtividade (BRANCO et al., 2003; CURY, 2002).

2.1.2 Manguezais

Os manguezais estão entre os ecossistemas mais produtivos da terra, são formados em regiões de planícies costeiras ou vales alagados limitados por baixios, em estuários e deltas que possuem águas ricas em material em suspensão e que não são perturbadas (VANUCCI, 1999). Sua formação e evolução estão associadas ao aporte de materiais sedimentares provenientes tanto do mar quanto do continente, tornando-os ambientes de transição (DELAUNE; PATRICK; BURESH, 1978). Ecossistema de manguezal é também a maior fonte de matéria orgânica das águas costeiras brasileiras (DITTMAN; NEILAN; BÖRNER, 2001), e estão entre os mais produtivos do planeta (BASHAN; HOLGUIM, 2002), no entanto, estas áreas são deficientes em

nutrientes especialmente em fósforo e nitrogênio (ZHANG et al., 2009), que são indispensáveis para o crescimento das plantas. Estão distribuídos pelo globo terrestre nas regiões tropicais e subtropicais (figura 1), ocorrendo em 112 países e territórios, entre as latitudes 30°S (Nova Zelândia e Austrália) e 30°N (Japão e Bermudas), sendo que Brasil, Indonésia e Austrália possuem o maior acervo de manguezais cobrindo cerca de 4.000.000 ha (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001; TOMLINSON, 1986).

Figura 1 - Distribuição geográfica dos manguezais no globo terrestre, detalhe em azul. Fonte: <http://reinaldo-biologando.blogspot.com/2009/06/conheca-o-ecossistema-de-mangue.html>. Acesso em 14 jun 2010

Os manguezais são extremamente importantes para a economia das regiões costeiras, sendo vital para o desenvolvimento sócio-econômico. Cerca de 70 atividades humanas são suportadas neste ambiente. O mangue fornece produtos florestais (lenha, carvão, mel, etc.) e de pesca (peixe, mariscos, caranguejos, camarões). Esses ambientes atraem abelhas e facilitam a atividade de apicultura em muitas áreas (KATHIRESAN; QASIM, 2005).

Além de mover a economia humana os manguezais atuam como protetores da costa contra radiação UV, efeito estufa, furacões, ciclones, enchentes e erosão. Também atuam como armadilhas de nutrientes. Este ambiente fornece fonte de alimento, criadouros e berçários para muitos animais marinhos (FIELD et al., 1998; FLORES-VERDUGO et al., 1990; KATHIRESAN; BINGHAM, 2001). Apesar, de seu elevado valor ecológico os manguezais encontram-se entre os ecossistemas tropicais mais ameaçados do mundo (FIELD et al., 1998),

sendo que, pelo menos 35 % dos manguezais mundiais foram degradados nas últimas duas décadas (VALIELA; BOWEN; YORK, 2001).

No Brasil, ecossistemas de manguezal são encontrados desde o extremo norte, no Estado do Amapá, até o sul, em Santa Catarina na foz do rio Araranguá (AQUINO, 1987). De acordo com Saenger (citado por SCHAEFFER-NOVELLI; MESQUITA; CINTRON-MOLERO 1990) existem cerca de 25.000 Km² de manguezais no país. Devido às várias atividades desenvolvidas nas regiões costeiras, além dos impactos naturais, o mangue está sujeito principalmente à ação antrópica das populações presentes nesse local. O desenvolvimento de atividades portuárias, industriais, pesqueira, de explorações minerais, turísticas entre outras, sem planejamento adequado, vem colocando em risco os atributos básicos dos estuários e ecossistemas associados, como os manguezais. Estas atividades favorecem o acúmulo de diferentes poluentes no solo, entre eles o petróleo, gerando impactos consideráveis, inclusive sobre a microbiota (CURY, 2002).

2.1.3 Contaminação do mangue por petróleo

A contaminação por petróleo causa danos severos ao ecossistema, e sua remoção é extremamente difícil e de alto custo (MASTALLER, 1996). Várias são as consequências ocasionadas por esta contaminação, dentre elas a desfoliação das árvores e a ação direta no crescimento e sobrevivência de *Rhizophora mangle*, espécie arbórea muito sensível a este tipo de contaminante. Lamparelli; Rodrigues e Moura (1997) descrevem que após o derramamento de petróleo no mangue do município de Bertioga, Brasil, ocorreu 25,9% de desfoliação das árvores de *Rhizophora mangle*, 43,4% de *Laguncularia racemosa* e 64,5% em *Avicennia schaueriana*. A presença deste contaminante pode persistir por dezenas de anos, Burns et al. (1994) ao avaliarem sedimentos contaminados com petróleo em manguezal, sugeriram que os efeitos nocivos permanecerão por pelo menos 20 anos após o desastre. A fauna presente no manguezal também é drasticamente afetada por este tipo de contaminação, tanto pela perda da superfície radicular, onde os mesmos podem se ancorar, como pela modificação do hábitat, pela diminuição da oxigenação e aumento da temperatura do solo. Os efeitos gerais deste tipo de contaminação podem ser divididos em quatro estágios: 1- efeitos imediatos; 2- danos estruturais; 3-

estabilização e 4- recuperação. A terceira e quarta fase podem levar muitos anos para ocorrer (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001), no Brasil 10 após a contaminação por petróleo no manguezal de Bertioga a recuperação ainda não tinha se iniciado (LAMPARELLI; RODRIGUES; MOURA, 1997).

2.1.4 Ilha do Cardoso/Cananéia e Bertioga

No litoral do estado de São Paulo o manguezal compreende uma área de aproximadamente 240 Km², e este ambiente vem sofrendo constantes pressões sócio-econômicas, dentre elas a construção de aterros para a implementação de marinas, condomínios náuticos e loteamentos, e a recepção de dejetos, esgotos e produtos químicos diversos. Do ponto de vista ecológico, essas áreas possuem grande importância, tanto no que se diz respeito à flora, com espécies adaptadas às condições de salinidade e carência de oxigênio, como à fauna, por constituírem abrigo para a reprodução e a alimentação (ROSSI; MATTOS, 2002).

O manguezal da Ilha do Cardoso se encontra no município de Cananéia, no extremo sul do litoral de São Paulo e está legalmente protegido desde a criação do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), pelo Decreto nº 40.319 de 03/07/1962. Este local é parcialmente isolado, cercado por baixa urbanização e não apresenta fontes potenciais de poluição química, proporcionando uma área de estudo de baixa interferência humana (FRUEHAUF, 2005). O clima é bastante úmido, o período menos chuvoso é entre abril e setembro com temperatura média de 18°C. O verão, apesar de mais quente (25°C), é bem mais chuvoso. Os manguezais do PEIC se formam no Canal do Ararapira e na Baía de Trapandé, na face ocidental da ilha. Além disso, uma extensa área próxima à floresta cobre a maior parte da planície litorânea da Ilha (SCHAEFFER-NOVAELLI; MESQUITA; CINTRON-MOLERO, 1990).

Na Baixada Santista está localizada a segunda maior área de manguezal do país (52%) (SCHAEFFER-NOVAELLI et al., 1990), possuindo uma cobertura vegetal de 1.716,6 Km², sendo que 6% correspondem a mangue. No município de Bertioga, componente da Baixada Santista, está localizado 8% da área total de manguezal do estado de São Paulo e 15% da Baixada Santista. Em 14 de outubro de 1983, por ocasião da abertura da Rodovia Rio-Santos (SP-55), uma rocha com cerca de 20 toneladas caiu sobre o oleoduto da Petrobrás, responsável pela

ligação entre o TEBAR (Terminal Marítimo Almirante Barroso), em São Sebastião e a RPBC (Refinaria Presidente Bernardes) em Cubatão. Com o rompimento do oleoduto houve vazamento de 3,5 milhões de litros de óleo cru. Praticamente todo petróleo derramado foi drenado para o Rio Iriri, alcançou o Canal de Bertiooga e atingiu extensas áreas de manguezal (SANTOS; CUNHA-LIGNON; SCHAEFFER-NOVELLI, 2007).

2.1.5 Micro-organismos do mangue

Segundo Kathiresan; Bingham (2001) o mangue constitui um ambiente ecológico único na diversidade de comunidades bacterianas. As bactérias ocupam um grande número de nichos e são fundamentais para o funcionamento destes habitats. Elas são particularmente importantes no controle de reações químicas neste local, como por exemplo: promoverem a fotossíntese, fixação de nitrogênio, metanogênese, bem como na produção de antibióticos e enzimas (arilsulfatase, L-glutaminase, quitinase, L-asparaginase, celulase, entre outras), podendo afetar diretamente a produtividade do ambiente (DAS; LYLA; KHAN 2006; DECHO, 2000), por exemplo, bactérias redutoras de sulfato são decompositores primários em solos anóxicos (SHERMAN; MEUNIER; COLÓN-LÓPEZ, 1998), bactérias na superfície podem sequestrar nutrientes e mantê-los dentro do sistema deficiente como o manguezal (ALONGI; CHRISTOFFERSEN; TIRENDI, 1993).

Muitas bactérias são de vida livre neste ambiente, porém algumas são epifíticas colonizando superfície de folhas ou outras partes da vegetação. A superfície das folhas, denominada de filosfera (RUINEN, 1956), é um habitat pouco estudado apesar de ser um amplo refúgio para organismos epifíticos. Estima-se que a superfície total mundial de folhas, as quais podem ser colonizadas por micro-organismos, seja em torno de $6,4 \times 10^8 \text{ Km}^2$ (LINDOW; BRANDL, 2003). Abril; Torres e Bucher (2005) citam que a maioria das importantes trocas de nutrientes é mediada por populações de micro-organismos presentes na interface filosfera-atmosfera. No entanto, este é um ambiente de condições extremas, principalmente devido às estruturas morfológicas e anatômicas, como por exemplo, a cutícula que cobre as células da epiderme e contribui como limitante nutricional, principalmente em fontes de carbono e nitrogênio (YADAV; KARAMANOLI; VOKOU, 2005). Bactérias são de longe os colonizadores

mais numerosos das folhas, frequentemente encontrados em números de cerca de 10^6 a 10^7 células cm^{-2} de folha (mais de 10^8 células g^{-1}) (FREIBERG, 1998; LINDOW; BRANDL, 2003).

2.1.6 Estudos realizados para avaliação da microbiota nos manguezais de Ilha do Cardoso e Bertioga

As áreas dos manguezais de Ilha do Cardoso e Bertioga têm sido alvo de estudos frequentes, tendo resultado em vários trabalhos de dissertações e teses abordando este tema. Alguns destes trabalhos estão listados abaixo:

- Cury (2002) analisou as comunidades de bactérias e archaeas do solo de Bertioga em várias profundidades, e verificou que este é um fator determinante para a diversidade destes micro-organismos e que os mesmos ainda não foram capazes de restabelecer o equilíbrio de atividade e de diversidade genética, mesmo após 20 anos de contaminação. Posteriormente Cury (2006), avaliou as variações na comunidade de bactéria e archaea em solo de manguezais de Cananéia sob diferentes vegetações, afirmando que a vegetação tem forte influência sobre a microbiota presente no solo.
- Nunes (2006) investigou a diversidade de bactérias e archaeas não cultivadas no solo do manguezal de Bertioga contaminado com petróleo, a autora concluiu que a contaminação ocorrida neste ambiente está selecionando micro-organismos mais adaptados às fontes de carbono introduzidas no solo.
- Dias (2008) avaliou a diversidade de bactérias no manguezal da Ilha do Cardoso em solo coletado no inverno e verão e em duas profundidades (0-10 e 30-40 cm), verificando que existe uma variação na distribuição da comunidade deste micro-organismo em relação à sazonalidade e, assim como Cury (2002), verificou que o fator profundidade foi determinante para o estabelecimento do perfil das comunidades totais de alfa-proteobactéria, beta-proteobactéria e actinobactérias.
- Sá (2008) analisou a diversidade de bactérias endoglucolíticas isoladas de *Rhizophora mangle* dos manguezais de Bertioga e Ilha do Cardoso, o autor verificou que vários isolados foram capazes de produzir a enzima

glucanohidrolase. A presença do gene de endocelulase foi confirmada por PCR em alguns isolados e ainda as bactérias endoglicolíticas mostraram-se halotolerantes.

- Gottardo (2009) estudou bactérias diazotróficas endofíticas existentes em *Rhizophora mangle* da Ilha do Cardoso, bem como avaliou a diversidade funcional e potencial biotecnológico destas bactérias.
- Canova (2009) observou a diversidade de actinobactérias rizosférica isoladas em manguezais da Ilha do Cardoso e Bertioga e avaliou a produção de metabólitos secundários antifúngicos, a autora afirma que as comunidades de actinobactérias são moduladas pela proximidade das plantas com o mar e pela contaminação pelo petróleo, ainda encontrou atividade antifúngica para *P. aphanidermatum* e *Phytophthora* sp.
- Mendes (2009) avaliou a estrutura de comunidades de bactéria, archaea e fungos presentes no solo do manguezal da Ilha do Cardoso. Os resultados permitiram ao autor concluir que o manguezal possui características exclusivas, com a presença de organismos distintos, revelando um possível potencial biotecnológico a ser explorado. Adicionalmente, os dados revelaram que a ação antrópica afetou as estruturas dessas comunidades de modo a ser notada uma sensível diminuição de diversidade no manguezal antropizado, evidenciando, dessa maneira, a importância da preservação desse ecossistema
- Silva (2010) realizou a caracterização molecular de cianobactérias isoladas de ecossistema manguezal da Ilha do Cardoso e Bertioga e identificação de produtos naturais, a autora gerou 42 sequências inéditas do gene de RNAr 16S de cianobactérias isoladas dos manguezais, indicou uma possível síntese de sideróforo pela linhagem *Phormidium* CENA135, com massa molecular e estrutura similar ao sideróforo synechobactina, também verificou a ação antimicrobiana de extratos dos isolados e detectou por ELISA a produção da toxina microcistina em 16 linhagens.

- Genuário (2010) isolou 50 linhagens de cianobactérias dos manguezais de Ilha do Cardoso e Bertioga, sendo 70% pertencentes à ordem Chroococcales, 18 à ordem Oscillatoriales e 12% à ordem Nostocales. As sequências do gene *rpoCI* de 16 linhagens foram comparadas com as depositados no GenBank e o autor infere que não foi possível fazer uma afiliação taxonômica entre as sequências disponíveis e as gerados no trabalho. Também avaliou o presença de gene *nifH*, bem como a fixação biológica do nitrogênio em organismos isolados nestes ambientes.

2.1.7 Cianobactérias

Estudos indicam que as populações de cianobactérias são um componente integral e principal da microbiota em manguezais (HUSSAIN; KHOJA, 1993; POTTS, 1979; POTTS; WHITTON, 1980; TOLEDO; BASHAN; SOELDNER, 1995b). Além de atuarem como produtores primários (fotossíntese) e de fixarem nitrogênio, possuem a capacidade de proteger o ambiente onde se localiza contra a contaminação por meio da sorção de metais pesados e da degradação de xenobióticos (EL-BESTAWY et al., 2007; FELLER; SITNIK, 1996; JUHASZ; NAIDU, 2000; SANDAU; SANDAU; PULZ, 1996). Nesse ambiente, as cianobactérias colonizam qualquer superfície: sedimentos, raízes, raízes aéreas, ramos e troncos (HICKS; SILVESTER, 1985; SHERIDAN, 1991; ZUBERER; SILVER, 1978).

As cianobactérias constituem um grupo dentro do domínio *Bacteria*, apresentam uma extensa distribuição, sendo encontradas em todos os tipos de ecossistemas terrestres e aquáticos, incluindo àqueles de condições extremas. De forma que a faixa de habitats ocupada pelas cianobactérias é maior do que o ocupado pela maioria dos eucariotos fototróficos (WATERBURY et al., 1979). Esta grande distribuição reflete a ampla variedade de espécies, as quais apresentam uma vasta faixa de propriedades fisiológicas e tolerância aos estresses ambientais (RAPALA et al., 1997). Formas marinhas empregam tanto a halofilia quanto a halotolerância como estratégias de sobrevivência. A diversidade de formas e arranjos desses micro-organismos é notável, podendo apresentar-se como unicelulares cocóides, bacilos, filamentosas ou filamentosas ramificadas multicelulares (WHITTON; POTTS, 2000). Não possuem flagelos, mas as espécies filamentosas geralmente possuem movimento deslizante e

podem migrar através de superfícies úmidas. Apesar de serem organismos de dimensões microscópicas, com tamanho de suas células variando entre 1 a 100 μm , muitas vezes podem ser visualizados a olho nu nos locais de ocorrência devido a formação de densos tapetes ou mantos contendo também algumas outras espécies microbianas (BROCK, 1973).

As cianobactérias têm uma longa história evolutiva na face da Terra. Evidências paleontológicas, geológicas e geoquímicas isotópicas indicam que esses organismos já existiam há aproximadamente 3500 milhões de anos (SCHOPF, 1996). Esses micro-organismos foram provavelmente os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva. A longa história evolutiva das cianobactérias é tida como a razão de sua abundante ocorrência nos mais diversos tipos de habitat modernos (SCHOPF, 1994).

A habilidade de utilizar N_2 como fonte de nitrogênio é restrita a somente alguns procariotos. Apesar do fato de que N_2 faz parte da atmosfera terrestre, as plantas e os animais continuam dependentes de fontes exógenas para suprir a necessidade de nitrogênio para seu crescimento e desenvolvimento (RAI; BERGMAN, 2002). Cianobactérias fixadoras de nitrogênio também ocorrem como epífitas em plantas que crescem em ambientes aquático ou com elevada umidade (FREIBERG, 1998; WHITTON; POTTS, 2000). Cianobactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de pneumatóforos de *Avicennia* em uma reserva de mangue na África do Sul fornecem 24,3% do requerimento anual deste nutriente no lodo do manguezal (MANN; STEINKE, 1992).

Evidências recentes indicam que esta simbiose deve ter iniciado a cerca de 600 milhões de anos atrás. Simbioses, particularmente envolvendo cianobactérias são muito comuns e uma característica importante na maioria dos ecossistemas do mundo (OSBORNE; BERGMAN, 2002)

A cianobactéria filamentosa não heterocitada *Microcoleus* sp., a qual produz colônias contendo muitos filamentos normalmente envolvidos por uma bainha, é a mais abundante no manguezal Balandra localizado em Baja California Sur no México (TOLEDO; BASHAN; SOELDNER, 1995a). Esse gênero tem sido encontrado mundialmente em quase todos os ambientes marinhos ou salobros (BASHAN et al., 1998; BRANCO et al., 2003). Embora as espécies de *Microcoleus* não apresentem heterócito, célula especializada onde ocorre a fixação do

nitrogênio, elas são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (BASHAN et al., 1998), contribuindo assim para a entrada desse nutriente no ecossistema. A cianobactéria não heterocitada, *Symploca* sp. S84, isolada de um manguezal em Sungei Buloh Nature Park em Singapura, também se mostrou capaz de fixar nitrogênio atmosférico em condições fotoautotróficas (KUMAZAWA; YUMURA; YOSHISUJI, 2001). No manguezal Maruhubi na Tanzânia, 10 gêneros de cianobactérias foram encontrados, sendo dois possuidores de heterócito (*Anabaena* e *Rivularia*) e oito sem heterócito (*Merismopedia*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Schizothrix* e *Spirulina*) (KYARUZI; KYEWALYANGA; MURUKE, 2003).

Espécies arbóreas presentes nos manguezais possuem raízes aéreas, como pneumatóforos, os quais abrigam uma densa população de cianobactérias. Toledo; Bashan e Soeldner (1995a) verificaram a distribuição de espécies de cianobactérias de acordo com a zona colonizada dos pneumatóforos, de maneira que espécies cocóides ocorrem na parte superior, filamentos não heterocitados na região mediana e filamentos heterocitados ocorrem principalmente na parte próxima ao solo. Algumas espécies demonstram ser capazes de produzir alterações morfológicas para adaptarem-se a condições de salinidade. A espécie *Calothrix viguieri*, isolada da superfície de raízes de mangue, mostra uma peculiar resposta morfológica para variação de salinidade, em baixa salinidade ela desenvolve estruturas em forma de “pêlos”, porém quando a salinidade é aumentada essas formas são eliminadas, esta alteração pode ser uma adaptação a pulsos de hidrólise de fósforo orgânico que ocorrem no habitat após fortes chuvas (MAHASNEH; GRAINGER; WHITTON, 1990).

Relatos têm indicado a diminuição da diversidade das cianobactérias devido a várias atividades antropogênicas, como perda e fragmentação de habitat, distúrbios e poluição, construção de represas e mudanças climáticas globais. Contudo, pesquisas sobre a diversidade de espécies de cianobactérias continuam bastante restritas. No Brasil, alguns estudos foram realizados por grupos de pesquisa nos estados de Pernambuco (BRANCO et al., 2003), Maranhão (NOGUEIRA; FERREIRA-CORREIA, 2001) e São Paulo (BRANCO; SILVA; SANT’ANNA, 1994; BRANCO et al., 1996a, 1996b). No entanto, a ocorrência de espécies foi relatada somente por meio de microscopia óptica. Porém na atualidade, métodos moleculares têm surgido como ferramentas confiáveis para a documentação da biodiversidade (LEE; ZO; KIM, 1996).

2.1.8 Métodos Moleculares

Nos últimos anos o interesse renovado nos estudos de taxonomia microbiana deve-se muito ao desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, as quais aumentaram a disponibilidade de métodos que permitem a identificação e classificação mais rápida e precisa dos micro-organismos (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999).

As técnicas moleculares que vêm sendo comumente empregadas para o estudo da diversidade de cianobactérias podem ser classificadas em abordagens independentes de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e baseadas em PCR (KUMARI; SRIVASTAVA; BHARGAVA et al., 2009). Análises de fragmentos de DNA amplificados por PCR é uma ferramenta poderosa que permite a detecção de moléculas de ácidos nucleicos específicos presentes em pequenas quantidades (STEFFAN; ATLAS, 1991), sem a necessidade de se ter o organismo isolado, de forma que o DNA pode ser extraído diretamente de amostras ambientais. Uma vez que, menos de 1% dos micro-organismos existentes são conhecidos por serem cultivados, as metodologias que são independentes de cultivo permitem alcançar os 99% que até o momento permanecem desconhecidos (DeLONG; PACE, 2001). Assim, metodologias que se baseiam na extração e amplificação do DNA direto de amostras ambientais são valiosas ferramentas utilizadas para tentar ampliar os conhecimentos destes grupos. O uso da PCR com iniciadores que flanqueiam a região genômica de RNAr 16S ou mesmo iniciadores específicos para outras regiões genômicas tem permitido a identificação taxonômica de micro-organismos sem os problemas de ocorrência de variações nos caracteres morfológicos, que tanto dificultam a taxonomia tradicional.

O gene RNAr 16S é o alvo do DNA mais utilizado em estudos de diversidade. Primeiramente a natureza da sequência com um mosaico de regiões altamente conservadas, conveniente para o desenho de iniciadores, interespaçadas com regiões variáveis e hipervariáveis, as quais permitem a separação entre espécies distintas, o torna perfeitamente adequado nas avaliações onde ocorrem inferências filogenéticas (figura 2). Além do mais, o vasto banco de dados de sequências disponíveis para este gene permite encontrar organismos cultivados relacionados, ou até mesmo se este não é o caso, a sequência pode ser comparada com a de outros micro-organismos e um ranking de parentesco pode ser gerado (árvores filogenéticas) (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995).

Durante as últimas décadas nosso entendimento sobre as relações evolutivas entre os micro-organismos tem se expandido dramaticamente, devido em grande parte ao uso de dados de sequências de RNAr 16S. Esta abordagem relatada primeiramente por Carl Woese e colaboradores (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990), tem se tornado tão amplamente utilizada que os dados de sequências desse gene serão a base para a definição de grupos taxonômicos na segunda edição do Manual de Bacteriologia de Bergey. Entretanto, alguns pesquisadores (FOX; WISOTZKEY; JURTSCHUK, 1992) questionam se o gene RNAr 16S apresenta variabilidade suficiente para permitir o discernimento entre espécies de um gênero ou linhagens de uma espécie. Tem sido sugerido que a região intergênica que separa os genes 16S-23S no operon do RNAr deva ser útil para discriminações de níveis refinados.

Figura 2 - Regiões hipervariáveis do gene RNAr 16S, marcadas por traços cinzas no eixo x, extraído de Ashelford et al., 2005

Diversas técnicas de “fingerprinting” que se baseiam na metodologia de PCR tem sido desenvolvidas para descrever a diversa comunidade de micro-organismos de vários ambientes, fornecendo um padrão ou perfil de diversidade genética da comunidade microbiana. Desta maneira, auxiliam os pesquisadores no que diz respeito ao entendimento sobre a estrutura e a diversidade das populações desses micro-organismos. Ainda, por serem de baixo custo, rápidas, de alta reprodutibilidade e por permitirem avaliar várias amostras ao mesmo tempo (*high throughput*) têm sido escolhidas pelos pesquisadores nos estudos de amostras ambientais. Estas ferramentas incluem: eletroforese em gel com gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* – DGGE) (MUYZER; de WALL; UITTERLINDEN, 1993), eletroforese em gel com gradiente de temperatura (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis* – TGGE) (ROSENBAUM; RIESNER, 1987; FELSKE et al., 1999), polimorfismo de tamanho de

fragmento terminais de restrição (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* – TRFLP) (MARSH, 1999), análise automatizada do espaço intergênico ribossomal (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* (ARISA) (RANJARD et al., 2001), entre outras.

2.1.8.1 DGGE

A técnica de DGGE foi primeiramente utilizada por Muyzer; de Wall e Uitterlinden (1993), onde os produtos de PCR são separados em géis de poliacrilamida contendo um gradiente desnaturante com concentrações crescentes de formamida e uréia. As variações na composição de nucleotídeos dos diferentes fragmentos de DNA determinam seu comportamento de migração no gel, fazendo com que fragmentos diferentes terminem sua migração em posições diferentes (MUYZER, 1999). Ainda, esta movimentação do fragmento de DNA no DGGE é governada não apenas pela composição de nucleotídeos (G+C), mas também pelas interações entre estes dentro da molécula (BRESLAUER et al., 1986). Deste modo, a técnica do DGGE permite investigar as comunidades de micro-organismos do solo, possibilitando apontar mudanças dentro da composição da comunidade.

Garcia-Pichel; Prufert-Bebout e Muyzer (1996) ao avaliarem a população de *Microcoleus chthonoplastes* isoladas de sete localidades diferentes verificaram que as bandas resultantes de DGGE foram idênticas e confirmaram, por sequenciamento, que esta cianobactéria está presente em todos os locais avaliados, tendo uma distribuição cosmopolita. Taton et al., (2003) investigaram a população de cianobactérias presentes em manto microbiano (“microbial mat”) e verificaram que as análises microscópicas identificaram apenas 6 morfotipos, enquanto que as avaliações moleculares, incluindo DGGE, identificaram 15 filotipos, assim, concluíram que as espécies endêmicas são mais abundantes do que anteriormente estimada por microscopia. Song et al., (2005) após análise de DGGE de solo, de uma região cultivada com arroz na China, encontraram 24 filotipos de cianobactérias. Sendo que este número apresentou uma variação sazonal, verificaram ainda que algumas cianobactérias estavam presentes somente enquanto o arroz estava sendo cultivado, em contrapartida, outras ocorreram somente após a colheita.

2.1.8.2 Biblioteca genômica

Outra abordagem molecular para estudar comunidades bacterianas em ambientes naturais é a construção de bibliotecas de sequências gênicas, com subsequente clonagem e sequenciamento (KELLY; CHISTOSERDOV, 2001; SUZUKI et al., 2001). O uso de bibliotecas de RNAr 16S para mapear a diversidade de organismos não cultiváveis tem se tornado um avanço revolucionário para se interpretar as relações evolucionárias microbianas (CLEMENTINO et al., 2007). De acordo com Brown et al. (2005), esta metodologia se tornou o “pão com manteiga” de muitos ecologistas microbianos. Ainda, os autores afirmam que este método fornece informações detalhadas de sequências representativas da comunidade, e sua utilidade como ferramenta na descoberta da diversidade e estabelecimento da filogenia é inquestionável, no entanto, ela é laboriosa, demorada e cara quando a tentativa é acumular dados suficientes para comparações estatísticas entre múltiplas amostras.

Lorenzi (2004) avaliou a população de cianobactérias presentes em represas do estado de São Paulo (Brasil) utilizando, além da técnica de DGGE, mini-bibliotecas de sequências do gene RNAr 16S e da região do espaço intergênico da ficocianina. A autora encontrou várias linhagens de *Microcystis aeruginosa* e também *Anabaena*, gêneros estes importantes por produzirem toxinas.

2.1.8.3 ARISA

Uma recente adição às várias técnicas de “fingerprint” de DNA é a análise automatizada do espaço intergênico ribossomal (ARISA) descrita por Fisher e Triplett (1999). Esta metodologia é capaz de distinguir populações microbianas baseada na heterogeneidade do tamanho da região intergênica dos genes RNAr 16S-23S, que é herdável entre os micro-organismos. A ARISA fornece uma análise acurada das comunidades (LEUKO et al., 2007) em um elevado nível de resolução taxonômica, a qual permite separação de espécies e em alguns casos até mesmo dentro de espécie com uma significativa reprodutibilidade (GIOVANNONI; STINGL, 2005; GUASP et al., 2000; KWON et al., 2005; XU; COTÈ, 2003). Além do mais, a natureza automatizada deste método possibilita análise de um grande número de amostras coletadas em diferentes locais ou tempo. O propósito do ARISA não é avaliar riqueza ou

composição de amostras simples, porém quando aplicado no contexto de uma questão ecológica e comparado com “fingerprints” de amostras diversas oferece conhecimento sobre direção de mudanças na composição da comunidade (GONZÁLEZ; ROMERO; ESPEJO, 2003; JONES et al., 2006; KENT et al., 2007; RANJARD; POLY; NAZARET, 2000).

Vários estudos têm demonstrado a robustez desta metodologia, no que diz respeito da produção de perfis equivalentes em números e intensidade de picos de múltiplas amplificações das mesmas amostras bem como de suas réplicas (BROWN; FUHRMAN, 2005; FISHER; TRIPLETT, 1999; YANNARELL; TRIPLETT, 2005). Também este método tem sido aplicado no estudo de comunidades microbianas, inclusive de cianobactérias, encontradas em uma ampla variedade de ambientes como comunidades: marinhas (BROWN; FUHRMAN, 2005; BROWN et al., 2005), de água doce (FISHER; TRIPLETT, 1999), das mais variadas localizações geográficas (HARTMANN et al., 2005; KWON et al., 2005; RANJARD; POLY; NAZARET, 2000; SOO, 2007; WOOD et al., 2008), mantos hipersalinos (YANNARELL; STEP; PEARL, 2006) e até mesmo de amostras de estromatólitos (LEUKO et al., 2007; HAVEMANN; FOSTER, 2008).

2.1.8.4 TRFLP

Como o próprio nome trata o TRFLP utiliza para avaliar o perfil de comunidades bacterianas o “polimorfismo do tamanho de fragmentos terminais de restrição”. De acordo com Liu et al., (1997) o TRFLP é tido como um método molecular quantitativo para análises rápidas de comunidades microbianas complexas, e foi desenvolvido para diminuir os custos e esforços nas análises da microbiota. Como outros métodos moleculares o TRFLP também é baseado na amplificação de genes alvos, no entanto, um ou ambos os iniciadores são marcados com fluoróforo, e posteriormente os produtos gerados são digeridos com enzimas de restrição e os fragmentos separados em eletroforese capilar (MARSH, 1999; TIEDJE et al., 1999). Apesar de ter sido desenvolvida para estudos utilizando o gene RNAr 16S, esta metodologia pode ser aplicada a qualquer gene de interesse, inclusive genes funcionais para um “screening” rápido na tentativa de se obter informações à respeito da atividade de comunidades em diferentes ambientes (ELBELTAGY; ANDO, 2005; MARSH, 1999; TIEDJE et al., 1999; THIES, 2007). O último passo do TRFLP é convenientemente realizado em um sequenciador automático, o qual fornece

uma saída em forma digital sendo que cada pico representa um fragmento terminal de restrição, uma vez que somente o final 5' do iniciador é marcado com um fluoróforo (MARSH, 1999). Este método é rápido, altamente reprodutível e frequentemente produz um número de unidades taxonômicas operacionais maior que outros métodos de “fingerprinting” por PCR comumente utilizados (OSBORN; MOORE; TIMMIS, 2000; THIES, 2007). Entretanto, em muitos casos picos individuais de um perfil de TRFLP determinado usando uma única enzima de restrição pode ser derivada de uma grande variação de espécies não correlatas, este método é utilizado para caracterizar alterações na estrutura de uma população, mas não identificar linhagens individuais em uma comunidade (RÖSCH; BOTHE 2005).

Lukow, Dunfield e Liesack (2000) verificaram que por meio desta metodologia foi possível observar a heterogeneidade espacial e temporal na composição estrutural da comunidade bacteriana de solo. Ainda, demonstraram que análises de réplicas parecem ser pontos cruciais na produção de conjuntos de dados representativos para o monitoramento dessas comunidades.

Esta ferramenta permite a utilização de genes funcionais para avaliar alterações na composição da microbiota de um determinado ambiente. Vários estudos têm sido conduzidos utilizando TRFLP para o gene *nifH* para avaliar a população de fixadores de nitrogênio, como em solos de florestas (RÖSCH; MERGEL; BOTHE, 2002, WIDMER et al., 1999), em solos com fertilização (TAN; HUREK; REINHOLD-HUREK, 2003), em intestino de cupins (OHKUMA; NODA; KUDO, 1999), em solos com diferentes manejos (POLY; MONROZIER; BALLY, 2001), raízes de manguezais (FLORES-MIRELES; WINANS; HOLGUIN, 2007), os autores confirmaram que esta ferramenta pode ser utilizada para monitorar gradientes fixadores de N₂ em ambientes aquáticos, solo e sedimentos.

Embora o N₂ seja o gás mais abundante na atmosfera terrestre, ele é extremamente não reativo. Antes que ele seja incorporado em moléculas biológicas, o N₂ tem que ser reduzido ao equivalente de amônia. Esta redução biológica é catalisada por um complexo enzimático multimérico, denominado nitrogenase. Esta enzima é irreversivelmente inibida por uma molécula de oxigênio e espécies reativas de oxigênio (BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003). A transformação do N₂ em amônia é conduzida por organismos conhecidos como diazotróficos, esses organismos são particularmente importantes em ambiente onde o nitrogênio é limitante para a produção primária (LANGOIS; LaROCHE; RAAB, 2005). Dentre os genes

funcionais utilizados como marcadores nos estudos de diversidade pode-se destacar o gene codificador da enzima nitrogenase (*nif*). Dentro do operon *nif* destaca-se o gene *nifH*, que codifica a enzima dinitrogenase redutase, a qual é uma enzima chave para o processo de fixação biológica do nitrogênio, este gene vem sendo amplamente utilizado para detectar bactérias fixadoras de nitrogênio, (POLY et al., 2001). Ele também tem uma região altamente conservada, bem como regiões variáveis, as quais podem ser utilizadas para a filogenia deste grupo de bactérias (MARIN, TERIXEIRA, BALDANI, 2003). Estudos recentes têm demonstrado que cianobactérias podem dominar tais populações fixadoras de nitrogênio, enquanto que a composição desta população pode variar de acordo com a estação do ano (YANNARELL et al., 2003).

2.1.8.5 Análise estatística

Devido à complexidade dos padrões de “fingerprinting” obtidos a análise estatística dessas metodologias é essencial para permitir uma comparação válida entre as comunidades estudadas (OROS-SICHLER et al., 2007). Valores de similaridade de pares de “fingerprints” podem ser calculados usando, como exemplo, o coeficiente de correlação de Pearson, e submetidos a um ranqueamento hierárquico pela aplicação de análises de permutações aleatórias para comparar estatisticamente a similaridade dentro e entre amostras (KROPF et al., 2004). Métodos de ordenação podem ser aplicados para auxiliar a análise de grandes conjuntos de dados e relacionar fatores abióticos com a estrutura da comunidade (OROS-SICHLER et al., 2007). O escalonamento multidimensional, por exemplo, é uma maneira de agrupar os dados e compará-los, respondendo questões sobre a influência de fatores abióticos na formação de comunidade microbiana (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998). Este método tenta representar o “fingerprint” da comunidade em poucas dimensões enquanto preserva a relação de distância entre os mesmos (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998).

2.2 Objetivos e perguntas biológicas

Apesar do grande avanço tecnológico na área das ciências biológicas, a falta de informações a respeito da estrutura e diversidade de comunidades de cianobactérias em ambientes de manguezal ainda é grande. Desta maneira, este estudo teve o intuito de contribuir na avaliação e conhecimento da diversidade de espécies deste grupo residentes em filosfera de diferentes espécies de árvore, bem como em solo de manguezais. Assim, esta pesquisa, possibilitou gerar conhecimentos importantes a respeito da diversidade de cianobactérias em ecossistemas brasileiros de manguezais.

O principal objetivo deste estudo foi descrever a diversidade de cianobactérias de ecossistemas de manguezais do Estado de São Paulo utilizando abordagens moleculares independentes de cultivo. Sendo que as seguintes perguntas biológicas foram levantadas:

- A população de cianobactérias que habita a filosfera é dependente da espécie de árvore colonizada e/ou da localização das árvores dentro do manguezal?
- A distribuição e diversidade de cianobactérias em solos de manguezais dependem de fatores abióticos, como propriedades químicas do solo?
- Existe diferença na população de cianobactérias que colonizam manguezais prístinos comparado com antropizado?
- As localidades dentro do manguezal influenciam a colonização do solo pelas cianobactérias?
- A contaminação por petróleo, ocorrida em 1983, ainda exerce efeito sobre a população de cianobactérias?
- Como ocorre a distribuição de diazotróficos nos manguezais avaliados?
- Existe diferença na população de diazotróficos comparando ambiente contaminado por petróleo com outro prístino?

2.3 Material e métodos

2.3.1 Descrição do local de coleta

O presente estudo foi conduzido com amostras coletadas em dois manguezais do Estado de São Paulo. O Parque Estadual da Ilha do Cardoso (figuras 3 e 4a), localizado no extremo sul do litoral de São Paulo, no município de Cananéia, abrange uma área de 15.100 ha, onde são encontrados todos os tipos de vegetação da Mata Atlântica costeira, a qual permanece intocada (90% do território), que proporcionam uma variedade extraordinária de ambientes e uma alta diversidade biológica. Os manguezais se formam no Canal do Ararapira e na Baía de Trapandé (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 1990). O segundo manguezal localiza-se na cidade de Bertioga (figuras 3 e 4b), onde se encontra a segunda maior área de manguezal do Brasil (SCHAEFFER-NOVELLI; MESQUITA; CINTRON-MOLERO, 1990). Em 14 outubro de 1983, ocorreu um vazamento de 3,5 milhões de litros de óleo do Rio Iriri em direção à área do manguezal (SANTOS CUNHA-LIGNON; SCHAEFFER-NOVELLI, 2007).

Tabela 1- Coordenadas geográficas dos locais de coleta nos manguezais Ilha do Cardoso e Bertioga

	PM	MM	PF
Ilha do Cardoso S	25°05'1.87"	25°05'6.88"	25°05'12.21"
Ilha do Cardoso W	47°57'41.1"	47°57'41.42"	47°57'41.21"
Bertioga S	23 53' 50,4"	23 53' 42,8"	23 53' 41,1"
Bertioga W	46 12' 30,6"	46 12' 30,1"	46 12' 32,3"

PM-próximo ao mar; MM-meio do manguezal; PF-próximo à floresta

Figura 3 - Mapa de Estado de São Paulo, destacando as cidades onde se encontram os manguezais avaliados neste estudo

Figura 4 - A) Vista do local de coleta próximo ao mar da Ilha do Cardoso, B) vegetação presente no manguezal onde foram realizadas as coletas em Bertioga

2.3.2 Amostragem de Folhas e extração de DNA:

Cerca de 5 folhas de 3 árvores das espécies *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa*, e *Rhizophora mangle* (figura 5), foram coletadas em três pontos ao longo de um

transecto demarcado no manguezal da Ilha do Cardoso (tabela 1), em setembro de 2007. Sendo que membros do gênero *Avicennia* foram encontrados apenas no primeiro ponto amostrado (próximo ao mar).

Figura 5 - Exemplos de: A) *Avicennia*, B) *Laguncularia*, C) *Rhizophora*

Três folhas de cada árvore amostrada foram colocadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de água ultrapura autoclavada, e submetidos à agitação por 1h. Após este período o líquido foi transferido para tubos plásticos de 50 mL e centrifugados por 20 min a 7000 x g. O sobrenadante foi descartado e o DNA total foi extraído do pélete resultante utilizando fenol-clorofórmio. De forma que o pélete foi ressuspensionado em 500 μ L de TE (Tris-HCl pH 7,8 10mM, EDTA 1mM), transferidos para microtubos, adicionados 10 μ L de sódio-dodecil-sulfato 10% e 0,1 g de *glass beads* (0,1mm) (Sigma, Washington DC, USA). Essa mistura foi agitada em um equipamento *Bead Beater* (BioSpec, Bartlesville, OK, USA) por 1 min (500 rev min⁻¹). Posteriormente foram adicionados 500 μ L de fenol tamponado pH 8,0 e centrifugado por 10 min à uma rotação de 10.000 x g, a fase aquosa foi transferida para um microtubo novo e uma purificação adicional usando 500 μ L de clorofórmio foi realizada. Uma nova centrifugação foi feita e a fase aquosa foi transferida novamente para microtubos novos, o DNA foi então precipitado adicionando-se 50 μ L de Na-acetato (5M, pH 5.2) e 280 μ L de isopropanol 100%. A mistura foi incubada em temperatura ambiente por 5 min e centrifugada por 10 min a 4 °C a 10.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o DNA peletizado foi lavado com 180 μ L etanol 70%. Os tubos foram centrifugados por 5 min a 10.000 x g em temperatura ambiente. Todo o etanol foi descartado e o precipitado resultante foi seco por 30 min e posteriormente

ressuspendido em água ultrapura autoclavada. A integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (vol/vol), corado com SYBR[®] Green I (1:1000) (Eugene, Oregon, USA), utilizando como marcador de peso e massa molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), visualizado e fotodocumentado em luz UV (Kodak Gel Logic 212 Image System, CT, USA).

2.3.3 Amostragem de Solos e extração de DNA:

Solos superficiais (0-10 cm) foram coletados em tubos plásticos em ambos os manguezais (Ilha do Cardoso e Bertioga) em três diferentes pontos de um transecto (perto ao mar – PM, meio do manguezal – MM e próximo à floresta – PF; equidistantes 100m), em três repetições para cada local (tabela 1), nos anos de 2007, 2008 e 2009.

O DNA total do solo foi extraído utilizando kit MO BIO PowerSoil DNA Isolation (Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Uma amostra de 250 mg de solo foi adicionado a um tubo *PowerBead* (2 ml) e agitado em vortex, 60 µL de uma solução C1 foram adicionados ao tubo com o solo, aquecido por 5 min a 60°C e resfriado em temperatura ambiente, por três vezes consecutivas. Então, o tubo foi agitado por 10 min à velocidade máxima em agitador Vortex-Genie[®] (MO BIO Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA) onde foi acoplado um adaptador (Vortex Adapter MO BIO Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA), logo após a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 30 s. Cerca de 450 µL do sobrenadante foi transferido para um microtubo (2mL) novo, então foram adicionados 250 µL da solução C2 e agitado. A mistura foi incubada por 5 min a 4°C, sendo novamente centrifugada a 10.000 x g por 1 min. O sobrenadante (cerca de 600 µL) foi transferido para um novo microtubo, onde foram adicionados 200 µL da solução C3 misturado por agitação e incubado novamente a 4°C por 5 min. Decorrido este período centrifugou-se a amostra por 1 min a 10.000 x g, e transferiram-se 750 µL do sobrenadante a um microtubo novo, sendo adicionados 1200 µL da solução C4 e agitado. A uma coluna acoplada em um microtubo de 2 mL foram transferidos 675 µL da mistura e então centrifugado por 1 min a 10.000 x g, a fração eluída foi descartada e o procedimento repetido até que todo o volume tivesse passado pela coluna. A coluna foi então lavada com 500 µL da solução C5 e centrifugou-se a 10.000 x g por 30 s. Para garantir que a

coluna tivesse sido completamente seca o volume que passou pela coluna foi descartado e novamente centrifugado por mais 1 min a 10.000 x g. A coluna foi então transferida para um microtubo limpo e o DNA foi eluído em 100 µL de solução C6. O DNA extraído foi checado e quantificado em gel de agarose 1%, corado com SYBR[®] Green I, utilizando como marcador de peso e massa molecular Low Mass DNA Ladder, visualizado e fotodocumentado em luz UV.

2.3.4 Análises químicas do solo

As análises químicas do solo foram realizadas no laboratório de Solos do departamento de Ciência do Solo da ESALQ, pelo doutorando Raphael Moreira Beirigo. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos fechados hermeticamente, mantidas sob refrigeração (aproximadamente 4°C) e transportadas até o laboratório, onde foi retirada uma subamostra para determinação do teor de umidade e posterior subtração do peso de amostra úmida utilizada para as análises de pH em H₂O, condutividade elétrica (C.E), NH₄⁺, NO₃⁻ e NO₂⁻. O pH em H₂O e C.E foram determinados na proporção solo-água (1:2,5) e (1:2) respectivamente (GAUTHEYROU, 2006). Os teores de NH₄⁺, NO₃⁻ e NO₂⁻ extraídos e determinados segundo (BREMNER; KEENEY, 1996).

Para realização das demais análises químicas as amostra passaram pela eliminação prévia de sais solúveis (lavagem das amostras com solução de álcool etílico 60%), segundo método (EMBRAPA, 1997). Posteriormente as amostras foram secas ao ar, passadas em peneira de malha de 2 mm e analisadas na forma de terra fina seca ao ar (TFSA). Cálcio, Mg e Al trocáveis foram extraídos com solução de KCl 1 mol L⁻¹ e quantificados por espectrofotometria de absorção atômica, K e Na trocáveis e P disponível foram extraídos com solução HCl 0,05 mol L⁻¹ H₂SO₄ 0,0125 mol/l (Mehlich-1), Na e K determinados e quantificados por fotometria de chama e P disponível determinado por colorimetria (SOIL SURVEY STAFF, 2009). O carbono e nitrogênio total foram determinados por combustão a seco em um analisador elementar (LECO[®] modelo CN-2000) em amostras de TFSA moídas e passadas em peneira de malha de 0,149 mm. Os solos foram classificados até nível de ordem segundo os parâmetros do sistema de classificação de solos norte americano (SOIL SURVEY STAFF, 2003).

2.3.5 Amplificação por PCR do gene 16S RNAr

A amplificação do gene 16S RNAr foi realizada primeiramente utilizando os iniciadores 27F1 (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e 1494Rc (5'TACGGCTACCTTGTACGAC3') (NEILAN et al., 1997), em um termociclador "Gene Amp[®] PCR System 9700" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Cada reação (25 µL) consistiu em: 0,5 U de *Taq platinum* DNA polymerase (Invitrogen-Brasil), 10 ng de DNA total, 2,5 µL de tampão de PCR 10X, cada iniciador numa concentração de 0,25 µM, 240 µM de cada dNTP, 0,01 mg BSA e 1µL formamida ultrapura. O ciclo utilizado para a amplificação foi de: 4 min de desnaturação inicial a 96°C, 25 ciclos de 96°C por 30 s, 50°C por 30 s, e 72°C por 1 min, extensão final de 72°C por 7 min.

Para a realização da metodologia de DGGE foi realizada uma *NESTED-PCR* como descrito previamente por Nübel et al., (1997), utilizando os iniciadores CYA359F (5'GGGGAATTTTCCGCAATGGG3'), acrescido de um grampo de 40 bases de GC (5'CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG3'), e CYA781a R (5'GACTACTGGGGTATCCTAATCCCATT3') e CYA781b R (5'GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT3'), em uma reação contendo tampão de PCR 1X, 7,5 mM de MgCl₂, 0,25 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP, em um volume total de 25 µL. A amplificação foi conduzida nas seguintes condições: 2 min a 95°C de desnaturação inicial, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 63°C por 1 min e 72°C por 1 min, e 7 min de extensão final a 72°C. Os produtos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR[®] GreenI, visualizado e fotodocumentado em luz UV.

2.3.6 DGGE

A metodologia de DGGE foi realizada utilizando o equipamento Ingeny phor U2 (Ingeny, Holanda). A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 6% (37,5:1 acrilamida:bisacrilamida) em solução tampão 0,5 X [0,04 M Tris base, 0,02 M acetato de sódio, e 10 mM EDTA (pH 7.4)]. O gradiente do gel de DGGE variou de 30 a 60% (para amostras de DNA de folha) e 40 a 60% (para amostras de DNA de solo), usando uréia e formamida como

desnaturante [100% desnaturante consistiu em 40% (vol/vol) formamida e 7 M uréia]. A eletroforese foi realizada numa voltagem constante de 100 V a 60°C por 15 h. Decorrido este tempo o gel foi corado com nitrato de prata (BLUM; BEIER; GROSS, 1987) e registrado em um transiluminador de luz branca (VariQuest 100, FOTODYNE Incorporated, Hartland, WI, EUA) com máquina fotográfica digital. O perfil de bandamento do DGGE foi avaliado utilizando o sistema de análise de imagem Bionumerics® (Applied Maths, NV). As bandas foram identificadas e uma matriz binária foi construída levando em consideração a presença e ausência das bandas.

2.3.7 Análise estatística do DGGE

Análise multivariada foi realizada para correlacionar os fatores ambientais com a ocorrência das bandas no DGGE utilizando Canoco 4.5 for Windows (Ter BRAAK; ŠMILAUER, 1998). A matriz de bandas foi considerada como representantes de espécies, e as variáveis ambientais como locais amostrados (locais) e os gêneros de árvores amostradas foram utilizados como fatores nominais, no estudo de filosfera. No caso da análise do gel de solo, foi incluído como variáveis ambientais as análises químicas realizadas nas mesmas amostras de solo.

Análise de agrupamento foi realizada pela metodologia de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS), utilizando as variáveis ambientais, tais como, espécies de árvores e locais de coleta como dados suplementares. Valores de *Stress* menores que 0,05 indicam que a configuração das amostras no espaço de ordenação apresenta baixa probabilidade de má interpretação; valores menores 0,1 garantem boa representação dos dados, quando menores do que 0,2 sugerem interpretação juntamente com outros métodos, e valores de *Stress* maiores do que 0,3 indicam uma representação de baixa aceitação (Ter BRAAK; ŠMILAUER, 2002).

2.3.8 Sequenciamento das bandas de DGGE de folhas

As bandas foram retiradas do gel utilizando um bisturi esterilizado e colocadas em microtubos contendo 50 µL de água ultrapura autoclavada, mantidas em estufa a 37°C por 4 h e a

4°C de um dia para o outro, a fim de permitir a difusão do DNA do gel para a água. Então, 3 µL da solução resultante foram utilizados como DNA molde em uma reamplificação conduzida com os iniciadores CYA 359F (sem o grampo GC) e CYA 781Ra e 781Rb (como descrito anteriormente). Subsequentemente, os produtos foram purificados com PEG, onde foram misturados 25 µL de PEG 20%-NaCl 2,5M ao produto de PCR, mantido em 37°C por 15 min, centrifugados a 10 000 x g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 63 µL de álcool etílico 80%, mantido em bancada por 2 min. Posteriormente, a solução foi centrifugada por 1 min a 10 000 x g, o sobrenadante foi eliminado, o produto seco em temperatura ambiente e eluído em água ultrapura autoclavada. Após a purificação o material foi submetido a uma nova amplificação, porém com kit de sequenciamento DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e o iniciador CYA 359F de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos foram precipitados adicionando 2 µL de Na-sódio: EDTA (1:1) e 60 µL de etanol 100%, centrifugado por 15 min a 10.000 x g, descartado o sobrenadante e posteriormente lavado com 180 µL de etanol 70% centrifugando-se por 15 min a 10.000 x g. O pélete foi seco a temperatura ambiente no escuro, ressuspensos em 10 µL de HI-DI formamida (Applied Biosystems, Warrington, UK) e sequenciados em um sequenciador de capilar ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.3.9 Construção da biblioteca genômica

As condições de amplificação para a construção das bibliotecas genômicas foram as mesmas utilizadas para o DGGE, como descrito anteriormente. As repetições das reações produzidas de cada amostra foram misturadas, purificadas com GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham Biosciences, São Paulo, Brasil) e ligadas em vetor de clonagem com o kit pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os plasmídeos recombinantes foram transformados em células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH5α (One shot TOP 10 Electrocomp *E. coli* - Invitrogen). As colônias transformantes foram selecionadas pela coloração branca - azul, em placas contendo meio LB Agar, X-gal e ampicilina, os dois últimos na concentração final de 100 µg mL⁻¹. Colônias brancas foram coletadas aleatoriamente, crescidas em 1 mL de meio LB líquido acrescido de ampicilina

(100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em placas de cultura com 96 poços de 2 mL cada. A presença do inserto foi confirmada através do PCR de colônia com os iniciadores para o vetor (M13F e M13R).

2.3.10 Sequenciamento da biblioteca genômica de amostras de DNA de folhas.

Os plasmídeos foram extraídos por lise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979). Sendo que as placas contendo os clones foram centrifugadas a 2254 x g por 6 min a 20°C, descartando o meio de cultura, ao peletizado foi adicionado 240 μL de solução GTE (glicose 50mM, Tris-HCl 25mM pH 8,0, EDTA 10mM pH 8,0) e agitou-se vigorosamente para ressuspender o pélete. Submeteu-se a placa a nova centrifugação, nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi descartado, o pélete foi novamente ressuspensionado em 80 μL da solução GTE e agitado vigorosamente, dos quais 60 μL foram transferidos para uma placa de fundo U, previamente acrescido de 2,5 μL de RNase (10 mg mL^{-1}), sendo adicionado 60 μL de NaOH/SDS (NaOH 0,2N; SDS 1%) e fechado por um selo adesivo, o conteúdo foi misturado por inversão da placa (10 vezes) e incubado por 10 min a temperatura ambiente. Decorrido este período, as placas foram centrifugadas a 2254 x g por 1 min, então 60 μL adicionados de uma solução de acetato de potássio 3M (30mL) e ácido acético glacial (5mL), misturado novamente por inversão e incubado por 10 min a temperatura ambiente. Após, as placas foram incubadas por 90 °C por exatos 30 min, sendo transferidas para o gelo por mais 10 min e centrifugadas a 2254 x g por 10 min. Todo o volume das placas foi então transferido para uma placa com filtro (Milipore PVDF 0,02 μm) acoplada à uma placa de fundo V e centrifugado por 4 min a 2254 x g. Adicionou-se ao material filtrado 100 μL de isopropanol absoluto, a placa foi selada e o conteúdo misturado por inversão. Centrifugou-se o material por 45 min a 2254 x g, descartando o sobrenadante, o precipitado foi lavado com 200 μL de etanol 70%, sendo centrifugado por mais 5 min a 2254 x g. O sobrenadante foi descartado e a placa foi submetida a um spin de 114 x g na posição invertida sobre um papel absorvente. As amostras foram secas em temperatura ambiente e posteriormente ressuspensas em 40 μL de água ultrapura autoclavada e armazenada a -20 °C.

A reação de sequenciamento foi realizada usando 200 ng de plasmídeo, 10 pmol do iniciador do vetor T7, 1 μL de DYEmanic ET Terminator, 2 μL de tampão (200 mM Tris-HCl pH 9.0 and 5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e água ultrapura esterilizada para um volume final de 10 μL , em

25 ciclos de 20 seg a 95 °C, 15 seg a 50 °C e 1 min a 60 °C. O produto foi precipitado com etanol 100%, como descrito no item 2.2.5, ressuspensionado em HI-DI formamida e sequenciado em ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer.

2.3.11 Sequenciamento da biblioteca genômica de amostras de DNA de solos.

Os plasmídeos clonados foram amplificados diretamente das células como descrito por Vergin; Rappe e Giovannoni (2001), utilizando os vetores do inserto M13. O produto foi purificado utilizando kit MinElute PCR Purification Kit (Qiagen), sendo uma placa com filtro e vácuo. O produto purificado foi enviado para ser sequenciado com o equipamento ABI 3730xl Genetic Analyzer (PE Biosystems) no W.M. Keck Center for Functional Genomics at the University of Illinois, usando kit de sequenciamento ABI Prism Big Dye terminator (PE Applied Biosystems) e o iniciador M13R.

2.3.12 Análises das sequências, definição de UTO e construção da árvore filogenética.

As sequências de nucleotídeos (*reads*) foram trimadas para a remoção de bases de baixa qualidade (parâmetro de qualidade >20) e retirada de fragmentos do vetor. As sequências válidas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) usando o programa DOTUR com um corte de 0,03 de dissimilaridade. As UTOs foram criadas a partir do parâmetro *Furthest neighbor*, onde todas as sequências dentro de cada UTO são no máximo 3% distante uma das outras (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005).

O parâmetro de distância evolutiva Jukes e Cantor foi calculado usando DNADIST do pacote PHYLIP 3.63 (FELSENSTEIN, 1985) após o alinhamento das sequências usando o programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2007) com penalidade de 15 de *gap-opening* e de 6,66 de *gap-extension* para pareamento a dois e múltiplo. As sequências válidas foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) pela ferramenta de busca BLAST, os organismos com maiores valores de porcentagem de cobertura, escore e identidade foram selecionados para representar cada clone.

As sequências de todas as bibliotecas foram reunidas e um novo agrupamento foi gerado de forma que os representantes das diferentes bibliotecas se acumulassem dentro da mesma UTO. Um clone representante de cada UTO foi selecionado, juntamente com sequências representativas dos gêneros de cianobactérias depositadas no GenBank, para a construção da árvore filogenética. Esta foi construída pelo programa MEGA 4 usando o método “Neighbor-Joining” – (NJ) (SAITOU; NEI, 1987) usando matriz de distância Kimura-2 parameter (KIMURA, 1980) foi realizado uma reamostragem de 1000 vezes (FELSENSTEIN, 1985).

2.3.13 Índices de riqueza, diversidade e curvas de rarefação

O número de sequências para cada UTO de cada biblioteca computada pelo DOTUR foi utilizado para a estimação de diversidade e riqueza também utilizando um corte de 0,03 de distância. A riqueza de cada biblioteca foi estimada pelos índices não-paramétricos de ACE (*Abundance-based Coverage Estimator*) (CHAO; LEE, 1992) e Chao1 (CHAO, 1984) e valores representativos de diversidade foram avaliados pelo índice de Shannon (estimador de máxima verossimilhança). Valores de rarefação de cada biblioteca foram gerados pela análise das UTOs pelo DOTUR e um gráfico foi construído utilizando o Excel. Dados de estimativa de cobertura foram gerados pelo programa SPADE. As diferenças estatísticas entre as bibliotecas foram avaliadas pelo programa S-Libshuff.

2.3.14 ARISA

Para a realização da metodologia ARISA, foi feita uma PCR com iniciadores específicos para cianobactérias descritos por Wood et al. (2008) e para o grupo de bactéria de acordo com Yannarell et al. (2003).

A amplificação de cianobactérias foram usados os iniciadores Cy-ARISA-F (5'-FAM-GYCAYRCCCGAAGTCRTTAC-3') e 23S30R (5'-CHTCGCCTCTG TGTGCCWAGGT-3'), em uma reação contendo 0,3 μ M de cada iniciador, 200 μ M de cada dNTP, 1X tampão de PCR, 1U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 4mM de $MgCl_2$ e 0,6 μ g

de BSA, para um volume total de 25 μ L, as condições de ciclagem foram: 94 °C por 2 min, para desnaturação inicial; 35 ciclos de 94°C por 45 s, 50°C por 30 s, 72°C por 2 min, com 7 min de extensão final em 72 °C.

A reação de amplificação de bactéria (25 μ L) consistiu de 0,5 U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase, 10 ng de DNA genômico, 2 μ L de 10X tampão de PCR, 0,4 μ M de cada iniciador, 250 μ M de cada dNTP, 3 mM $MgCl_2$, 0,25 mg mL^{-1} BSA. Os ciclos de PCR usados para a amplificação foram: após desnaturação inicial em 94 °C por 2 min, 30 ciclos de 94 °C por 35 s, 55 °C por 45 s e 72 °C por 2 min foram conduzidos, então a reação foi mantida a 72°C por 2 min.

Os produtos do PCR foram diluídos em água esterilizada na proporção de 1:5 e separados em eletroforese capilar usando ABI 3730xl Genetic Analyzer no W.M. Keck Center for Functional Genomics at the University of Illinois. As condições de eletroforese foram de 63°C, 15 kV por um tempo de corrida de 120 min usando polímero POP-7. Um padrão de peso molecular 100 – 1250 ROX size standard (Bioventures) foi usado como marcador interno para os perfis de ARISA. Os fragmentos de ARISA foram processados usando o software GeneMarker version 1.85 (SoftGenetics) (figura 6), picos com unidade de fluorescência maior que 200, e tamanho entre 300 e 1000 pares de bases foram incluídos na análise (figura 7).

Figura 6 - Janela de análise do programa GeneMarker, onde cada pico representa uma população de microrganismo no ambiente avaliado, e o conjunto de picos demonstra a comunidade do grupo analisado

2.3.15 Análise dos dados de ARISA

A área dos picos gerados pela eletroforese foi exportada para um arquivo do programa Excel, e os dados foram normalizados de acordo com a fluorescência relativa (cada área de pico dividida pela soma total de áreas de picos em cada tratamento). A análise estatística foi realizada utilizando o software PRIMER 6 package (PRIMER-E Ltd., Plymouth, UK). Análise de similaridade usando Bray Curtis foi conduzida para avaliar o nível de similaridade entre as amostras, o teste de ANOSIM foi realizado como ferramenta estatística para comparação das amostras. Correlação baseada no coeficiente de Spearman foi determinada baseada nos valores encontrados pela similaridade obtida pelos dados da análise de Bray Curtis. A análise de correspondência foi conduzida usando o software CANOCO 4.5 for Windows, sendo que os dados ambientais como: mangue (Bertioga e Ilha do Cardoso), ponto de coleta, ano de coleta e nível de contaminação foram utilizados como fatores nominais.

Figura 7 – Exemplo de perfis de eletroferograma obtidos para as análises de ARISA avaliados pelo GeneMarker

Análise multivariada de escalonamento multidimensional não métrico NMDS (*Non-metric multidimensional scaling analysis*) foi realizada com os mesmos dados utilizando o software PRIMER 6 package, onde foi construída uma matriz de similaridade pelo coeficiente Bray Curtis.

2.3.16 TRFLP

Para a realização da metodologia de TRFLP a região do gene *nifH* foi amplificado com os iniciadores descritos no trabalho de Rösch; Bothe (2005). Numa reação de 50 μ L composta de 1X de tampão de PCR, 100 μ M de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0,5 mg mL⁻¹ BSA, 10 μ M de cada iniciador (nifHF - AAA GGY GGW ATC GGY AAR TCC ACC AC e nifHRb - TGS GCY TTG TCY TCR CGG ATB GGC AT) e 2,5U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase. Sendo que ao iniciador nifHF foi adicionado na extremidade 5' o fluoróforo 6-FAM e à extremidade 5' do iniciador nifHRb o fluoróforo HEX. Para amplificação o seguinte ciclo foi empregado: desnaturação inicial em 96°C por 20 s, 1 ciclo 96°C por 20 s, 65°C por 30 s e 72°C por 30 s, 2 ciclos de 96°C por 20 s, 62°C por 30 s e 72°C por 35 s, 3 ciclos de 96°C por 20 s, 59°C por 30 s e

72°C por 40 s, 4 ciclos de 96°C por 20 s, 56°C por 30 s e 72°C por 45 s, 35 ciclos de 96 °C por 20 s, 54 °C por 30 s e 72 °C por 50 s, com uma extensão final de 72°C por 10 min. Após a amplificação os fragmentos foram checados por eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídeo (0,2 mg mL⁻¹) e registrado em fotodocumentador.

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit de purificação MinElute PCR Purification Kit eluidos e concentrados em 20 µL de água ultrapura estéril. Então uma alíquota de 10 µL da purificação foi submetida à restrição com as enzimas *MspI* e *HhaI* em uma reação de 0,75 µL de tampão para a enzima, 10 µL de PCR purificado, 3,6 µL de água ultrapura e estéril e 0,15 µL de BSA (10mg mL⁻¹), e mantidas a 37°C por no mínimo 4 horas. Decorrido este período e produto da restrição foi diluído em ultrapura estéril na proporção de 1:5 e enviados para o W.M. Keck Center for Functional Genomics at the University of Illinois para separação dos fragmentos por eletroforese em capilar. Foi utilizado como marcador de peso molecular ABI GeneScan ROX 1000.

2.3.17 Análise dos dados de TRFLP

Assim como para os dados de ARISA, o produto resultante da eletroforese foi avaliado utilizando o software GeneMarker version 1.85, com limite de corte de 50 unidades de fluorescência e fragmentos de tamanho entre 50 e 400 pares de bases, separadamente para cada iniciador e cada enzima. Onde foi gerado um total de quatro perfis para cada amostra.

Os perfis gerados foram exportados para um arquivo no formato Excel normalizados de acordo com a fluorescência relativa, concatenados para cada amostra e então analisados através do software PRIMER 6 package, onde foi construída uma matriz de similaridade pelo coeficiente Bray Curtis e foi realizada a análise multivariada NMDS.

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Diversidade de Cianobactérias na filosfera

Este é o primeiro trabalho realizado que utiliza ferramentas moleculares para avaliar a estrutura da população de cianobactérias colonizadoras de filosfera de árvores presentes em manguezais. Metodologias moleculares capazes de acessar elementos não cultivados foram utilizadas para comparar o perfil da população de cianobactérias (DGGE) nos três diferentes gêneros de árvores do manguezal da Ilha do Cardoso, bem como as diferentes localizações destas árvores dentro do manguezal, e também acessar a composição desta população pelo uso de biblioteca genômica do RNAr 16S, sendo que estas metodologias apresentaram resultados congruentes. A região de RNAr 16S selecionada para as análises compreende os loci variáveis V3 e V4, os quais contém informações significantes para inferências filogenéticas (YU; MORRISON, 2004), e permitiram o acesso a 19 gêneros de cianobactérias.

Comparado com a maioria dos habitats bacterianos, a filosfera tem sido relativamente pouco estudada, mesmo sendo um ambiente de grande importância devido à abundância das plantas no mundo (LINDOW; BRANDL, 2003; LAMBAIS et al., 2006). Ainda, poucas pesquisas têm sido conduzidas para se avaliar cianobactérias colonizadoras da filosfera (FÜRNKRANZ et al., 2008; UKU et al., 2007). Os dados do presente estudo avaliados pela metodologia de DGGE foram indicativos de que a população deste microrganismo é aparentemente homogênea entre as diferentes árvores amostradas, e apesar de ter certa influência da espécie de árvore colonizada a população varia principalmente de acordo com o ambiente onde se localizam as árvores dentro do manguezal (figura 8). O perfil eletroforético encontrado indica que a população desse grupo de microrganismos é pouco diversa nesse ambiente, uma vez que a presença de poucas bandas foi verificada. As árvores localizadas no bosque apresentam colonização de cianobactérias mais diversa dentro do manguezal, enquanto que as amostras de próximo ao mar e próximo à floresta demonstram um perfil eletroforético bastante similar.

Figura 8- Perfil de bandas de DGGE para filosfera de *Avicennia*, *Laguncularia* e *Rhizophora* do manguezal de Ilha do Cardoso - Cananéia. M – marcador; linhas 1-3 *Avicennia* próximo ao mar; 4-6 *Laguncularia* próximo ao mar; 7-9 *Rhizophora* próximo ao mar; 10-12 *Laguncularia* meio do manguezal; 13-15 *Rhizophora* meio do manguezal; 16-18 *Laguncularia* próximo à floresta; 19-21 *Rhizophora* próximo à floresta. Números no gel referentes às bandas excisadas para sequenciamento

Pela análise do dendograma de similaridade do perfil eletroforético, pode-se verificar que as sequências de RNAr 16S formam clados distintos de acordo com os locais dentro do manguezal, e subagrupamentos de acordo com as espécies de árvores dentro de cada local, indicando que a localização é o principal fator de variação para a colonização de cianobactérias (figura 9).

Figura 9- Dendograma de similaridade do perfil eletroforético obtido pela metodologia de DGGE das amostras de folha do manguezal – APM- *Avicennia* próximo do mar; LPM- *Laguncularia* próximo do mar; RPM – *Rhizophora* próximo do mar; LMM- *Laguncularia* meio do manguezal; RMM – *Rhizophora* meio do manguezal; LPF – *Laguncularia* próximo da floresta; RPF – *Rhizophora* próximo da floresta.

Trinta e duas bandas foram excisadas e sequenciadas (figura 8 – tabela 2), demonstrando uma predominância do gênero *Symphyonemopsis* VAPOR 1, uma cianobactéria encontrada em cavernas da Espanha (HOFFMANN; GUGGER; ASECIO-MARTINEZ, 2003), principalmente nas amostras obtidas dos locais de próximo ao mar e à floresta. Estas sequências também estão fortemente relacionadas àquelas publicadas para o gênero *Brasilonema*, as quais foram descritas como colonizadoras de filosfera (FIORE et al., 2007; AGUIAR et al., 2008). Também, sequências com similaridade a cianobactérias não cultiváveis foram encontradas em todos os locais amostrados, especialmente no meio do manguezal.

Tabela 2 - Comparação das sequências obtidas das bandas de DGGE de filosfera de árvores de manguezal com aquelas depositadas no GenBank

Amostra	Tamanho Fragmento (pb)	Organismos mais próximo no GenBank	N. Acesso	Cobertura (%)	Identidade (%)
DGGE-1	405	Uncultured cyanobacterium clone 2SU40_F54	DQ531908	97%	98%
DGGE-2	362	Uncultured <i>Prochlorococcus</i> sp. clone SIMO-831	AY712368	97%	85%
DGGE-3	418	Uncultured cyanobacterium clone 2SU40_C16	DQ531893	92%	98%
DGGE-4	409	Uncultured cyanobacterium clone 2SU40_F54	DQ531908	94%	98%
DGGE-5	390	<i>Leptolyngbya</i> sp. Hubel 1974/235	EU586736	99%	96%
DGGE-6	405	<i>Symphyonemopsis</i> sp. VAPOR1	AJ544085	98%	96%
DGGE-7	413	<i>Symphyonemopsis</i> sp. VAPOR1	AJ544085	97%	96%
DGGE-8	409	Uncultured cyanobacterium clone 2SU40_F54	DQ531908	94%	98%
DGGE-9	412	Uncultured <i>Synechococcus</i> sp. clone CB11H07	EF471564	100%	99%
DGGE-10	358	<i>Symphyonemopsis</i> sp. VAPOR1	AJ544085	96%	96%
DGGE-11	340	Uncultured cyanobacterium clone 2SU40_F54	DQ531908	100%	98%
DGGE-12	415	Uncultured cyanobacterium clone 2SU40_F54	DQ531908	93%	97%
DGGE-13	401	<i>Fischerella</i> sp. HKAR-5 16S	GQ375051	100%	99%
DGGE-14	364	<i>Leptolyngbya</i> sp. Hubel 1974/235	EU586736	98%	89%
DGGE-15	410	<i>Leptolyngbya</i> sp. Hubel 1974/235	EU586736	100%	97%
DGGE-16	326	Uncultured cyanobacterium clone 2SU40_F54	DQ531908	100%	98%
DGGE-17	412	<i>Gunnera manicata</i> chloroplast	GQ998357	96%	98%
DGGE-18	410	<i>Leptolyngbya</i> sp. Hubel 1974/235	EU586736	100%	96%
DGGE-19	412	<i>Symphyonemopsis</i> sp. VAPOR1	AJ544085	100%	98%
DGGE-20	364	Uncultured <i>Prochlorococcus</i> sp. clone SIMO-831	AY712368	100%	97%
DGGE-21	402	<i>Gunnera manicata</i> chloroplast	GQ998357	100%	99%
DGGE-22	332	Pseudanabaenaceae cyanobacterium VUW26	GQ451427	100%	96%
DGGE-23	414	<i>Anabaena crassa</i> CENA207	FJ830578	100%	100%
DGGE-24	401	<i>Anabaena flos-aquae</i> DC-2	EU780156	92%	88%
DGGE-25	405	<i>Symphyonemopsis</i> sp. VAPOR1	AJ544085	99%	97%
DGGE-26	407	<i>Leptolyngbya</i> sp. Hubel 1974/235	EU586736	100%	97%
DGGE-27	413	<i>Symphyonemopsis</i> sp. VAPOR1	AJ544085	99%	97%
DGGE-28	414	<i>Leptolyngbya</i> sp. Hubel 1974/235	EU586736	100%	97%
DGGE-29	417	<i>Anabaena crassa</i> CENA207	FJ830578	98%	99%
DGGE-30	412	Uncultured cyanobacterium clone 2SU40_F54	DQ531908	88%	99%
DGGE-31	408	Uncultured cyanobacterium clone 2SU40_F54	DQ531908	99%	98%
DGGE-32	412	<i>Symphyonemopsis</i> sp. VAPOR1	AJ544085.1	99%	97%

A análise multivariada NMDS gerada a partir dos perfis eletroforéticos do DGGE representa os resultados a respeito da variação da colonização das folhas pelas cianobactérias nas diferentes localidades do manguezal (figura 10). Quando se analisa a colonização referente às árvores localizadas próximo ao mar (figura 10a), fica claro que existe uma diferença entre as espécies que habitam as folhas das diferentes árvores (*Stress* 0,13), de maneira que *Avicennia*, *Laguncularia* e *Rhizophora* formam agrupamentos distintos. No entanto, ao se avaliar a colonização de cianobactérias das árvores presentes nas três localidades (figura 10b) (*Laguncularia* e *Rhizophora*), os dados obtidos das amostras de cada ponto do manguezal formaram agrupamentos separados (*Stress* 0,10), indicando que existe uma forte tendência das cianobactérias se diversificarem de acordo com a localização no ambiente, de maneira que esta variável passa a ter maior força, e o efeito da variação na colonização entre espécies de árvores passa a ser diluído.

A composição da população de cianobactérias da filosfera foi avaliada pela construção de uma biblioteca genômica do gene RNAr 16S. Somente sequências com qualidade de sequenciamento maiores do que 20 foram consideradas. Dessa forma, 497 clones foram utilizados nas análises, distribuídos da seguinte maneira: 82, 71 e 72 clones de *Avicennia*, *Laguncularia* e *Rhizophora*, próximo ao mar, respectivamente; 54 e 64 clones de *Laguncularia* e *Rhizophora* no meio do manguezal e 80 e 74 pertencentes a *Laguncularia* e *Rhizophora* presentes próximo à floresta (tabela 3).

A riqueza de espécies foi avaliada pelos estimadores não paramétricos Chao1 e ACE (tabela 3). O índice de Chao1 usa o número de UTO com uma única ou duas sequências para estimar o número de espécies faltantes, pois de acordo com o autor esta informação está concentrada nestas UTOs (CHAO, 1984). Já o índice de ACE, proposto por Chao; Lee (1992), as espécies observadas são separadas em grupos raros e abundantes, e somente os grupos raros são usados para estimar o número de espécies faltantes. A biblioteca construída para *Avicennia* apresentou o menor valor para esses índices, enquanto que *Rhizophora* localizada próximo ao mar apresentou os maiores valores.

Figura 10 - Análise multivariada de escalonamento multidimensional não-métrico do perfil de DGGE das amostras de folhas de *Avicennia*, *Laguncularia* e *Rhizophora*, nas três localidades do manguezal da Ilha do Cardoso- Cananéia. a) agrupamento para as três espécies de árvores localizadas próximo ao mar, b) agrupamento para o perfil de *Laguncularia* e *Rhizophora* amostradas nos três locais de coleta. LPM-*Laguncularia* próximo ao mar; LMM-*Laguncularia* bosque; LPF-*Laguncularia* próximo à floresta; RPM-*Rhizophora* próximo ao mar; RMM-*Rhizophora* bosque; RPF- *Rhizophora* próximo à floresta

Um padrão referente à riqueza de espécies e gênero de árvore ou local de coleta não foi observado para estes indicadores, de forma que o menor e o maior valor estão no mesmo local de coleta. Apesar de existir um indicativo de que *Avicennia* apresenta menores valores de riqueza e diversidade. Também, existe uma tendência sugestiva de que *Laguncularia* apresente maior riqueza de espécies em sua filosfera com relação à *Rhizophora*, pois aquela apresentou tanto para as amostras avaliadas no meio do manguezal quanto próximo à floresta maiores índices de riqueza (tabela 3), porém *Laguncularia* próximo ao mar apresentou valores intermediários (ACE-29,8 e Chao1-36,5) entre *Avicennia* e *Rhizophora* (ACE: 13,8 – 52,6 e Chao1: 15,0– 41,0 respectivamente). De uma forma geral, diferentemente do encontrado por Uku et al. (2007), a colonização de cianobactérias de filosfera do manguezal avaliado se dá principalmente à localidade, ao invés do gênero de árvore. As folhas de *Avicennia* contêm estruturas especializadas denominadas glândulas de sal, assim chamadas pelo fato de excretar sal para o controle osmótico (CLOUGH, 1984; SHIMONY; REINHOLD, 1973), esta estrutura está ausente nas folhas dos demais gêneros estudados, e provavelmente o sal se apresenta como uma variável que limita a colonização de cianobactérias nas folhas de *Avicennia*. Freiberg (1998) afirma que a composição química dos exudatos e a disponibilidade de nutrientes na filosfera podem ser fatores que influenciam sua colonização.

Ao se avaliar a diversidade de espécies, pelo índice de Shannon, a mesma situação é verificada, onde *Laguncularia* próximo ao mar (1,55) apresentou um valor inferior a *Rhizophora* (2,56) e superior a *Avicennia* (1,31) (tabela 3), porém nas demais localidades aquele gênero apresentou valores de diversidade superiores à *Rhizophora*. A vantagem deste índice é que ele leva em consideração o número de espécies e a homogeneidade da comunidade. O índice aumenta tanto pelo maior número de espécies únicas quanto pela menor homogeneidade de espécies no local amostrado (ZHANG et al., 2008).

Os valores dos estimadores observados fortemente suportam os dados obtidos e representam com qualidade o ambiente nas condições avaliadas, uma vez que o índice de cobertura estimada (ICE) para todos os casos foi superior a 87% (tabela 3), e a rarefação calculada para as bibliotecas (figura 11) indica que a probabilidade de se encontrar uma UTO nova é pequena, uma vez que a curva se encontra próxima de atingir a assíntota para todos os casos.

Tabela 3 - Distribuição de gêneros, comparação de UTOs, índices de riqueza e diversidade cobertura estimada para bibliotecas do gene RNAr 16S de filosfera de *Avicennia*, *Laguncularia* e *Rhizophora* localizadas em três pontos do manguezal da Ilha do Cardoso

Biblioteca Gênero	APM	LPM	RPM	LMM	RMM	LPF	RPF
Não Cultivável	19	11	16	43	40	18	15
<i>Anabaena</i>	3					3	
<i>Brasilonema</i>	5						1
<i>Leptolyngbya</i>	13	24	17			19	26
<i>Prochlorococcus</i>	1	2	11	1	2		
<i>Scytonema</i>	1						
<i>Symphonemopsis</i>	38	32	22	5	6	38	29
<i>Synechococcus</i>	2	1	3	1	1		
<i>Xenococcus</i>		1	2		1		
<i>Fischerella</i>			1				
<i>Planktothrix</i>				3	6		
<i>Cyanobacterium</i>					2		
<i>Microcoleus</i>					1		
<i>Phormidium</i>					2	1	
<i>Rivularia</i>					2		
<i>Oscillatoria</i>					1		
<i>Nostoc</i>				1			1
<i>Hidrocoleum</i>						1	
<i>Acaryochloris</i>							1
<i>Raphidiopsis</i>							1
Clones total	82	71	72	54	64	80	74
UTOs	11	12	23	18	17	17	11
ACE	13,8±2,7	29,8±18,5	52,6±18,7	43,5±19,2	29,0±8,9	47,5±22,0	24,7±13,2
Chao 1	15,0±5,3	36,5±31,1	41,0±14,4	43,0±24,2	27,7±10,3	42,0±24,2	29,0±23,6
Shannon	1,31±0,14	1,55±0,12	2,56±0,10	2,19±0,11	2,04±0,15	1,82±0,14	1,47±0,12
Simpson	0,44±0,16	0,30±0,12	0,11±0,03	0,16±0,04	0,23±0,06	0,27±0,09	0,32±0,13
ICE	0,953	0,919	0,871	0,886	0,892	0,888	0,924

Figura 11 - Curvas de rarefação de cobertura de sequências obtidas para as bibliotecas genômicas de RNAr 16S de filosfera de *Avicennia*, *Laguncularia* e *Rhizophora* localizadas no manguezal de Ilha do Cardoso-Cananéia. APM-*Avicennia* próximo ao mar; LPM-*Laguncularia* próximo ao mar; RPM-*Rhizophora* próximo ao mar; LMM-*Laguncularia* bosque; RMM-*Rhizophora* bosque; LPF-*Laguncularia* próximo à floresta; RPF- *Rhizophora* próximo à floresta

Ao se comparar as bibliotecas genômicas pela ferramenta estatística S-libshuff (tabela 4) verificou-se que as bibliotecas referentes às amostras da filosfera das três localidades avaliadas, diferem estatisticamente uma das outras, confirmando o encontrado pela metodologia de DGGE, de forma que a localidade exerce uma forte influência na colonização de cianobactérias nas folhas, subseguido da espécie de árvore.

Tabela 4 - Valores de p para comparação múltiplas entre bibliotecas genômicas RNAr 16S das populações de cianobactérias de filosfera do manguezal Ilha do Cardoso (distância evolutiva 0,03)

	APM	LPM	RPM	LMM	RMM	LPF	RPF
APM	-	0.0631	0.1816	0	0	0.0362	0.0396
LPM	0.1139	-	0.1101	0	0	0.0319	0.0119
RPM	0.0054	0.0003	-	0	0	0	0
LMM	0	0	0	-	0	0	0
RMM	0	0	0	0	-	0	0
LPF	0.1198	0.0685	0.0271	0	0	-	0.0328
RPF	0.0787	0.0197	0.526	0	0	0.0016	-

Um total de 19 de gêneros de cianobactérias, representantes das quatro ordens de acordo com a classificação de Komárek e Anagnostidis (1989, 1999, 2005), foi observado nas folhas das árvores avaliadas (tabela 3), sendo oito gêneros pertencentes ao grupo de organismos heterocitados e 11 ao de não-heterocitados. Verificou-se uma predominância de gêneros pertencentes às ordens Oscillatoriales (seis gêneros), Nostocales (seis gêneros) e Chroococcales (cinco gêneros) e em menor número Stigonematales (dois gêneros). No entanto, foi observado que em número de sequências houve uma dominância de representantes da ordem Stigonematales, de maneira que sequências com alta similaridade ao gênero *Symphyonemopsis* foi bastante representativa nas amostras avaliadas de indivíduos tanto próximo ao mar quanto próximo à floresta, seguido de *Leptolyngbya*, assim como encontrada pelo sequenciamento das bandas do DGGE. Kyaruzi; Kyewalyanga e Muruke (2003), ao estudar biofilmes formados em manguezais da Tanzânia, encontraram 10 gêneros, cinco dos quais também estiveram presentes nas amostras do deste estudo, como: *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Rivularia*, *Microcoleus* e *Anabaena*. Ao contrário dos dados apresentados por Branco et al., (2003), os quais afirmaram que nos manguezais brasileiros ocorre uma predominância de gêneros das ordens Chroococcales

e Oscillatoriales, o presente estudo indicou que na filosfera de árvores de manguezais ocorre a predominância de representantes das ordens Nostocales e Oscillatoriales. Estudos realizados com diversidade de cianobactérias em pneumatóforos de *Avicennia* indicaram que estes microrganismos colonizam de forma particular cada porção do pneumatóforo, sendo que foram encontrados filamentos de *Lyngbya* e *Oscillatoria* na parte inferior (próxima ao solo), acima desta zona ocorreu a predominância de filamentos de *Microcoleus*, e na porção superior houve principalmente a ocorrência de formas cocóides como *Aphanothece* (TOLEDO; BASHAN; SOELDNER, 1995a)

Symphyonemopsis é um gênero da ordem Stigonematales, a qual compreende micro-organismos filamentosos, com a presença de heterócitos (células especializadas onde ocorre a fixação de nitrogênio), podendo ser encontrados em ambientes de água doce e subaéreos (GUGGER; HOFFMANN, 2004). Apesar de estes micro-organismos apresentarem heterócito, trabalhos a respeito da fixação de nitrogênio são inexistentes. Pela árvore filogenética pode-se observar a formação de agrupamentos congruentes entre as UTOs representantes dos gêneros de cianobactérias juntamente com as sequências depositadas no GenBank. Assim como encontrado por Fiore et al. (2007) e Aguiar et al. (2008), a sequência de *Shymphyonemopsis* depositada no GenBank forma um agrupamento monofilético com as de representantes de *Brasilonema*, juntamente com as UTOs 11, 12 e 15, que compreendem sequências com identidade com “*Symphyonemopsis* VAPOR1”, e as UTOs 13, 14 e 39 representantes de sequências com identidade com cianobactérias não cultiváveis, clado este suportado pelo valor de reamostragem de 64 (figura 12). “*Symphyonemopsis* VAPOR 1” é a única sequência depositada no banco de dados para este gênero, baseada na espécie tipo *S. katiniensis*, e apesar de ser morfológicamente distinta de *Brasilonema*, agrupa filogeneticamente aos membros deste gênero, no entanto “VAPOR 1” não pode ser considerada como típico ou linhagem referência para *Symphyonemopsis* (FIORE et al., 2007).

Brasilonema é um gênero recentemente descrito (FIORE et al., 2007; AGUIAR et al., 2008), pertencente à ordem Nostocales, onde estão os representantes de cianobactéria heterocitadas. Foi isolado de folhas de bromélia (*B. bromeliae* – FIORE et al., 2007), de folhas de eucalipto (*B. octagenarum* UFV-E1 - AGUIAR et al., 2008) e de orquídeas (*B. octagenarum*

UFV-OR1 - AGUIAR et al., 2008), semelhante às sequências das UTOs 11, 12 e 15, isoladas de folhas de *Avicennia*, *Laguncularia* e *Rhizophora*.

O gênero *Leptolyngbya* está compreendido na ordem Oscillatoriales, apesar de não possuir heterócito, apresenta uma grande capacidade de fixar nitrogênio, este processo ocorre predominantemente na fase escura do dia (FIORE; HONDA, 2008; MISRA; TULI, 2000; RAI; BORTHAKUR; BERGMAN, 1992; REJMÁNKOVÁ; KOMÁRKOVÁ; REJMÁNEK, 2004; YAMAZAKI; NOMATA; FUJITA, 2006).

A presença de indivíduos filamentosos heterocitados e também não-heterocitado, porém que fixam nitrogênio, tem uma importância ecológica marcante, uma vez que eles participam da ciclagem e disponibilização deste nutriente para a planta. A fixação de nitrogênio é um processo biológico conduzido por micro-organismos conhecidos como diazotróficos. Estes organismos são particularmente importantes em ambientes onde o nitrogênio é um fator limitante para a produção primária, por serem os únicos capazes de converter o N_2 molecular em NH_4^+ , que é a uma das formas assimiláveis de nitrogênio (KARL et al., 2002). Abril; Torres e Bucher (2005) afirmam que a interface entre a superfície das folhas e a atmosfera é um ambiente fundamental na ciclagem de nutrientes, em especial o nitrogênio. Estes autores ainda citam que este processo é o principal mecanismo para o ganho de ácido húmico nos ecossistemas tropicais, por causa da substancial demanda de nutrientes resultante da produtividade de plantas superiores e limitado pela baixa disponibilidade deste nutriente no solo. Cianobactérias isoladas de pneumatóforos de *Avicennia* na reserva de manguezal Beachwood, na África do Sul, suplementam em 24,3% o requerimento anual deste nutriente (KATHIRESAN; BINGHAM 2001), ainda, níveis de fixação do nitrogênio são maiores em manguezais com a presença de cianobactérias (TOLEDO; BASHAN; SOELDNER, 1995b). Freiberg (1998) avaliou cianobactérias que colonizam quatro espécies de árvores localizadas na Cordilheira de Tilarán, Costa Rica, e verificou que as espécies mais frequentes encontradas nas folhas foram: *Scytonema javanicum* e *S. hofmanni*. Juntas elas cobriram mais de 10% da superfície da folha e foram as principais responsáveis pela fixação do nitrogênio.

Pela árvore filogenética (figura 12) observou-se uma grande congruência entre as UTOs representantes de cada gênero com as sequências encontradas no banco de dados (GenBank). Verificou-se também que UTOs com sequências similares à cianobactérias não cultiváveis se

agruparam com sequências de Chroococcales como UTOs: 33, 42, 35, 26, 21 e 24, indicando que muitas cocóides existentes na natureza ainda não foram acessadas e permanecem desconhecidas.

Cianobactérias simbiontes de plantas ocorrem em várias espécies. Na maioria das simbioses o primeiro benefício para a planta é a fixação de nitrogênio promovido pela cianobactéria, enquanto que a cianobactéria ganha acesso a um ambiente estável e a uma variedade de nutrientes providos pelo hospedeiro (KRINGS et al., 2008). Hipóteses baseadas em evidências indiretas sugerem que a simbiose de plantas com cianobactérias são associações antigas, que datam cerca de 600 milhões de anos atrás (OSBORNE; BERGMAN, 2002; RAVEN, 2002; USHER; BERGMAN; RAVEN, 2007).

Um dado importante deste estudo está na formação de um clado separado na árvore filogenética com as UTOs representantes de sequências de cianobactérias não cultiváveis. Este fato representa um forte indício de que novos gêneros ainda não acessados estão presentes na filosfera destas árvores, indicando que muito ainda há para se descobrir a respeito deste grupo bacteriano tão importante.

Sendo assim, verificou-se que o gênero *Laguncularia* indica conter o maior número de espécies diferentes nas condições avaliadas. As metodologias utilizadas apresentaram resultados similares, mostrando que os dados encontrados estão próximos da realidade encontrada no ambiente avaliado.

Figura 12 - Árvore filogenética inferida pelo método de Neighbor-Joining (Kimura 2-parameter) de seqüências de RNAr 16S (359-781) de clones de cianobactérias colonizadoras de filosfera de árvores de manguezal (Ilha do Cardoso), baseados em 1000 reamostragens. Valores dentro dos parênteses indicam o número de clone em cada biblioteca, APM- *Avicennia* próximo ao mar; LPM - *Laguncularia* próximo ao mar; RPM - *Rhizophora* próximo ao mar; LMM- *Laguncularia* meio do manguezal, RMM - *Rhizophora* meio do manguezal; LPF - *Laguncularia* próximo à floresta; RPF - *Rhizophora* próximo à floresta

2.4.2 Diversidade de Cianobactérias de solos dos manguezais

2.4.2.1 DGGE e Biblioteca do gene 16S RNAr

A diversidade de cianobactérias em manguezais tem sido explorada por vários autores (BRANCO; SILVA; SANT'ANNA, 1994; BRANCO et al., 1996a; BRANCO et al., 1997; GENUÁRIO, 2010; SANT'ANNA, 1995; SILVA, 2010). No entanto, apenas metodologias de cultivo, ou mesmo observações por microscopia da amostra ambiental foram empregadas nos estudos citados. De acordo com Torsvik; Ovreas (2002), menos de 1% de micro-organismos de solo observados em microscopia é cultivado e caracterizado, sendo que existem 10^9 mais bactérias na Terra do que estrelas no Universo (CURTIS; SLOAN, 2004). Este estudo é o primeiro a avaliar a população de cianobactérias de manguezais utilizando-se de ferramentas moleculares independentes de cultivo, o que possibilitou acessar um grande número de genomas ainda não citados em literatura.

Análises químicas de solos coletados nos manguezais no ano de 2008 demonstram que os solos que ocorrem nas áreas da Ilha do Cardoso e em Bertioga próximo ao mar são classificados como Entisols e em Bertioga no meio do manguezal e próximo à floresta como Histosols. Entisols é a classificação que se dá aos solos pouco desenvolvidos, ou seja, que passaram por poucas alterações desde a sua formação, e caracterizado por uma ausência virtual de horizontes pedogênicos, de forma que síntese de minerais e alterações são consideradas mínimas em Entisols (GRAHAM; HERBERT; ERVIN, 1988). Já Histosols são solos com elevado acúmulo de matéria orgânica e principalmente com alto conteúdo de carbono (EVERETT, 1983), esta diferenciação pode ser decorrida do acúmulo de petróleo nessas áreas. Os valores de C.E de 2,40 a 10,82 dS/m, mesmo sendo elevados não caracterizam os solos como sálico (C.E ≥ 30 dS/m; Soil Survey Staff, 2003), mas evidenciam o gradiente de salinidade entre as áreas. Os valores de pH de 2,1 a 3,1 encontram-se na faixa de reação ultra-ácida (SCHOENEGER et. al., 2002) e os elevados teores de Na e Al torna este ambiente com condições extremas para a existência de plantas e microorganismos.

O gel de DGGE referente às amostras coletadas no ano de 2008 (figura 13) demonstra a variabilidade existente nestes ambientes. Ao avaliar os dados pela análise multivariada CA (figura 14) verificou-se que as populações de cianobactérias residentes em solos dos manguezais

de Ilha do Cardoso e Bertioga são distintas, e existe principalmente um efeito da presença da floresta sobre estas populações. Entretanto, houve o agrupamento dos perfis eletroforéticos das amostras coletadas no ponto próximo ao mar dos diferentes manguezais, demonstrando que este local é intensamente influenciado por fatores ambientais, sendo que existe um forte indicativo de que as condições de maré compõem esses fatores, uma vez que ocorre a formação de um gradiente de salinidade maior no local próximo ao mar diminuindo para o local próximo à floresta em ambos os manguezais. Pelas análises químicas os fatores como concentração de sódio (Na), magnésio (Mg) e condutividade elétrica exercem uma grande influência sobre o ponto próximo ao mar em ambos os manguezais analisados, reforçando esta hipótese.

Figura 13 - Gel de DGGE das amostras de nested PCR de solo de Ilha do Cardoso (IC) e Bertioga (B). M-marcador, 1-3 IC próximo ao mar, 4-6 IC meio do manguezal, 7-9 IC próximo à floresta, 10-12 B próximo ao mar, 13-15 B meio do manguezal, 16-17 B próximo à floresta

Estudos de mantos microbianos encontrados em regiões sobre influências de marés demonstram que cianobactérias são mais resilientes a condições hipersalinas e com estresse de água, em relação a outros microrganismos, e estes fatores, principalmente a salinidade podem ser responsáveis por alterações nas taxas de cianobactérias presentes em tais locais (YANNARELL; STEPPE; PAERL, 2006).

Os dados que dizem respeito aos elementos que fazem parte do ciclo do nitrogênio parecem estar desbalanceado no manguezal de Bertioga, pois verificou-se que no ponto próximo

à floresta os nutrientes NH_4^+ e em especial NO_2^- estão influenciando fortemente a população de cianobactérias. Bonin et al. (1990) demonstraram que em solos contaminados com óleo o processo de desnitrificação pode ser inibido. Esta situação aumenta a hipótese de que cianobactérias juntamente com outros diazotróficos são importantes fixadores de nitrogênio neste local, e que o NH_4^+ que é produzido pode estar se acumulando devido à inibição do processo de desnitrificação. Kucharski et al. (2010) também encontraram em experimento *in vitro* que solo contaminado com produtos derivados de petróleo modificam o processo de nitrificação, ainda observaram aumento nos níveis de NH_4^+ . Por outro lado, no manguezal da Ilha do Cardoso este ciclo parece estar balanceado, ou seja, as cianobactérias estão agindo juntamente com outros diazotróficos produzindo amônia e este nutriente pode ser consumido pelo sistema, confirmado pelos baixos níveis de NO_3^{-2} e principalmente de NO_2^- . Estes dados reforçam as informações de que o manguezal da Ilha do Cardoso é um ecossistema que está em equilíbrio.

Tabela 5 - Atributos químicos do solo dos manguezais de Ilha do Cardoso (IC) e Bertioga (B) coletados nos pontos: próximo ao mar (PM), meio do manguezal (MM) e próximo à floresta (PF)

Amostras	Tipo de solo	C.E dS/m	pH	C %	N %	NH ₄ ⁺ mg/Kg	NO ₃ ⁻² mg/Kg	NO ₂ ⁻ mg/Kg	P mg/Kg	Ca mmolc/Kg	Mg mmolc/Kg	K mmolc/Kg	Na mmolc/Kg	Al ³⁺ mmolc/Kg
IC-PM	Entisols	10,82	2,1	6,72	0,41	10,18	12,11	0,20	32,79	5,88	4,53	4,41	63,77	101,03
IC-MM	Entisols	4,16	2,7	2,24	0,11	9,55	12,60	0,00	73,88	2,40	1,28	2,77	8,87	18,03
IC-PF	Entisols	2,40	2,4	2,90	0,12	1,84	10,27	0,00	33,40	4,00	0,42	0,96	6,20	19,73
B-PM	Entisols	7,41	2,8	7,39	0,46	7,51	10,13	0,00	349,54	6,70	4,22	10,19	61,45	61,97
B-MM	Histosols	5,30	3,1	23,68	1,37	18,56	10,51	0,00	197,25	8,25	4,92	9,74	53,33	46,73
B-PF	Histosols	4,47	2,1	10,93	0,54	5,94	13,03	1,84	194,68	10,87	3,17	7,97	42,90	135,43

Figure 14 – Diagrama de ordenação de Análise de Correspondência (CA) para dados obtidos a partir do DGGE de RNAr 16S de cianobactérias de solo dos manguezais de Ilha do Cardoso e Bertioga coletados em 2008 em difentes pontos dentro do manguezal., IC – Ilha do Cardoso, B- Bertioga; PM- próximo ao mar, MM – meio do mangue, PF próximo à floresta

As bibliotecas do gene RNAr 16S claramente mostraram diferenças entre os locais de coleta (tabela 6). A curva de rarefação (figura 15) indica que as amostras estão próximas de alcançar a assíntota, e os elevados valores de cobertura estimados (tabela 7) fornecem grande confiança aos resultados apresentados, demonstrando que o esforço amostral foi satisfatório neste caso.

Figura 15 - Curvas de rarefação de cobertura de sequências obtidas para as bibliotecas genômicas de RNAr 16S de solo dos manguezais de Ilha do Cardoso (IC) e Bertioga (B) nos diferentes pontos de coleta. PM-próximo ao mar, MM-meio do manguezal, PF-próximo à floresta

Diversidade alfa é a diversidade de espécies encontradas dentro de um local (FORNEY; ZHOU; BROWN, 2004). O local com menor composição de espécies (diversidade) foi no meio do manguezal de Bertioga (1,77), e o maior valor foi observado no local próximo à floresta também no manguezal de Bertioga (3,47) os demais locais tiveram valores semelhantes (cerca de 2,0) avaliados pelo índice de Shannon (tabela 7). A riqueza foi analisada pelos índices de Chao1 e ACE. Os resultados indicaram que os menores valores foram observados próximo ao mar em ambos os manguezais (Ilha do Cardoso 85, 63 e Bertioga 38, 42, Chao1 e ACE respectivamente). Enquanto que nos manguezais a localidade próxima à floresta teve populações mais ricas (Ilha do Cardoso 98, 254 e Bertioga 324, 260, Chao1 e ACE respectivamente) (tabela 7), estes dados elucidam os encontrados para DGGE, o qual mostrou que a floresta apresentou uma forte influência sobre a população de cianobactérias. Surpreendentemente os maiores valores foram encontrados no local com maior contaminação com óleo, no qual era espera-se a ocorrência de menor diversidade e riqueza devido a esta contaminação.

A diferença na composição de espécies entre locais é referida como beta diversidade (FORNEY; ZHOU; BROWN, 2004), a qual foi analisada pela comparação das bibliotecas

utilizando o programa S-Libshuff. Quando as sequências de todas as bibliotecas foram agrupadas um total de 100 UTOs foi obtido (figura 16), cujas 61 foram “singletons” (UTO de sequência única) (tabela 7). Todos os locais de coleta mostraram diferenças nas sequências recuperadas (tabela 7), isto demonstra que o ambiente seleciona a população de cianobactérias dentro do gradiente formado nos manguezais. Zhang et al. (2008) colocam que o programa libshuff é um bom teste de sobreposição de bibliotecas, o mesmo possibilitou verificar diferenças estatísticas por comparações recíprocas pareadas entre as bibliotecas.

Tabela 6 - Valores de p para comparação múltiplas entre bibliotecas genômicas RNAr 16S das populações de cianobactérias de solo dos manguezais Ilha do Cardoso e Bertioga (distância evolutiva 0,03)

	ICPM	ICMM	ICPF	BPM	BMM	BPF
ICPM	-	0	0	0,0001	0	0
ICMM	0,0001	-	0	0,0005	0	0
ICPF	0,0002	0	-	0	0,0001	0,0820*
BPM	0,0133	0,0299	0	-	0	0
BMM	0,0000	0	0	0	-	0
BPF	0,0000	0	0,0028	0	0	-

Monte Carlo 1000 permutações, 95% , P-value=0,0000. *não difere estatisticamente.

A afiliação filogenética das sequências feitas pela ferramenta BLASTn usando o banco de dados GenBank resultou num total de 17 gêneros distintos de cianobactérias (tabela 7, figura 17). Sequências correspondentes à *Synechococcus* e especialmente *Prochlorococcus* foram encontradas em grandes quantidades nos locais próximo ao mar em ambos os manguezais, e em menores quantidades na Ilha do Cardoso nos demais pontos. *Prochlorococcus* é um dos gêneros mais abundantes de cianobactérias na terra (PARTENSKY; HESS; VAULOT, 1999). Nos ecossistemas de oceanos a fixação do carbono é dominada pelas cianobactérias marinhas *Prochlorococcus* e *Synechococcus*. Juntas, elas têm demonstrado contribuir entre 32 a 80% da produção primária em oceanos oligotróficos, neste sentido apresentam um papel significativo no ciclo do carbono do nosso planeta (PARTENSKY; HESS; VAULOT, 1999, KOKSHAROVA; WOLK, 2002). Outra importância de organismos do gênero *Synechococcus* diz respeito à fixação de N₂, (FIORE; HONDA 2008; MITSUI et al., 1986; MITSUI et al., 1987; SPILLER; SHANMUGAM, 1987) apesar da célula especializada para a fixação do nitrogênio, o heterócito, estar ausente neste gênero, eles separam os dois processos temporalmente, fazendo fotossíntese

durante o dia e fixação de nitrogênio à noite, em um ciclo circadiano bem definido (FALCÓN et al., 2002; GOLDEN et al., 1997; LEÓN; KUMAZAMA; MITSUI, 1986). Um fato interessante foi que nenhuma sequência destes gêneros foi encontrada em Bertioga nos pontos contaminados. Gonzáles et al. (2009) em um experimento de microcosmos demonstraram que *Prochlorococcus* e *Synechococcus* desapareceram em tratamentos com baixa e alta concentração de óleo em um período de 24h. Echevest; Dagustí e Dachs (2010) também observaram a redução do número de células *Prochlorococcus* e *Synechococcus* sob efeitos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) em culturas e em comunidades naturais. Estes autores sugerem que o tamanho da célula é um fator importante determinando a sensibilidade ao PAHs, e que a população natural foi menos resistente do que as células crescidas em cultura.

Sequências de RNAr 16S semelhantes à cianobactérias não cultiváveis foram abundantes em todos os pontos amostrados. Confirmando a existência uma grande quantidade de micro-organismos que ainda não foram acessados por métodos de cultivo, e assim, existe uma ampla diversidade a ser descoberta. Também, sequências com identidade com *Aphanocapsa*, *Cyanobium*, *Cyanothece*, *Gloeotheca*, *Leptolyngbya*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Arthronema*, *Limnithrix*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Tolypothrix*, *Tychonema* e *Xenococcus* foram encontradas.

Sant'Anna (1995), ao fazer um levantamento por métodos de microscopia óptica de cianobactérias da Ilha do Cardoso, cita a presença de 18 gêneros, entre eles três presentes na biblioteca deste estudo sendo: *Aphanocapsa*, *Oscillatoria* e *Phormidium*. Neste trabalho, a autora indica que as espécies encontradas tiveram maior diversidade nas zonas supralitorâneas (região que recebe apenas os borrifos das ondas e marés excepcionalmente altas); na zona mesolitorânea (área sob ação direta das marés), a riqueza e a abundância diminuíram sensivelmente em relação à supralitorânea e a autora não encontrou cianobactérias na zona infralitorânea (área que só fica emersa em marés excepcionalmente baixas). Branco et al. (1996a, 1996b e 1997) estudaram a presença de cianobactérias também por microscopia óptica no manguezal da Ilha do Cardoso e encontraram 10 gêneros da ordem Chroococcales e 11 da ordem Oscillatoriales, sendo que três de cada ordem foram observadas neste estudo, como: *Synechococcus*, *Gloeotheca*, *Xenococcus* e *Leptolyngbya* *Oscillatoria*, *Phormidium*, respectivamente. Os autores concluem que a ordem Oscillatoriales é muito abundante nesta área. No entanto, ao se utilizar métodos não-cultiváveis, pode-se observar o elevado número de cocóides, especialmente de picocianobactérias não

descritas nos trabalhos acima citados. Provavelmente os autores tiveram dificuldade em encontrar essas espécies por serem de tamanho diminuto e de difícil visualização. Em estudo realizado recentemente nos manguezais de Bertioga e Ilha do Cardoso, cianobactérias foram isoladas e o gene RNAr 16S sequenciado de: 15 *Synechococcus*, uma *Aphanothece*, 12 *Chlorogloea*, uma *Cyanothece*, oito *Leptolyngbya*, uma *Phormidium*, quatro *Nostoc* e uma *Microchaete* (SILVA, 2010), dos quais cinco gêneros também estão representados na biblioteca deste estudo. A autora relata a importância deste estudo uma vez que várias sequências ainda não estão disponíveis para os gêneros estudados.

Em manguezais do estado de Pernambuco foi observada a predominância de Oscillatoriales em comparação com as demais ordens de cianobactérias. Os autores sugerem que esse fato possa refletir a maior adaptabilidade dos organismos filamentosos homocitados às condições ambientais dos manguezais (BRANCO et al., 2003). Assim como na biblioteca de RNAr 16S deste estudo, a maioria dos táxons encontrados foram *Oscillatoria*, *Xenococcus*, *Phormidium*, *Leptolyngbya*, representantes de ambientes salobros e marinhos descrito por diversos autores em variadas localizações geográficas (CARTER, 1933; DOR, 1984; KOSTER, 1960; LAMBERT; STEINKE; NAIDOO, 1989; NOGUEIRA; FERREIRA-CORREIA, 2001; SANT'ANNA, 1995; SANT'ANNA; BICUDO; PEREIRA, 1983; SANT'ANNA et al., 1985, 1995; SANT'ANNA; SIMONETTI, 1992; SILVA, 1991).

Poucas UTOs foram observadas em comum para todos os locais amostrados, como UTO 1 e 6, ambas com similaridade com cianobactérias não cultiváveis, sendo que a UTO 1 é a mais abundante em número de sequências, num total de 84 sequências. Algumas UTOs foram preferencialmente de um local amostrado, todas também com similaridade à cianobactérias não cultiváveis (CPM – 9 e 24; CMM – 3 e 15; BPM – 13; BMM – 12; BPF – 10), a exceção é a UTO 10 que se assemelha com o gênero *Arthronema*, porém com baixa similaridade (em torno de 82%), de forma que não houve agrupamento desta UTO com as sequências disponíveis para este gênero na árvore filogenética. Duas UTOs (7 e 9) foram observadas exclusivamente na Ilha do Cardoso e a UTO 24 (cianobactéria não cultivável) foi exclusiva de Bertioga, encontradas nos três locais amostrados. As UTOs 22 (cerca de 82% de similaridade com *Limnothrix*) e 23 (cianobactéria não cultivável) foram encontradas nos locais próximo à floresta em ambos os manguezais (figura 16 e 17).

No meio do manguezal e próximo à floresta da Ilha do Cardoso foram observadas as UTOs 32 e 33 representativos dos gêneros *Nostoc* e *Anabaena*, respectivamente. As UTOs com identidade com *Prochlorococcus* e *Synechococcus* (8, 5 e 4), como discutido acima, foram observadas principalmente nos pontos próximos ao mar em ambos os manguezais e meio do manguezal e próximo à floresta somente na Ilha do Cardoso. Várias UTOs foram exclusivas de somente um local de coleta (ICPM – 14, 21 e 29; ICM – 19; ICPF – 34 e 35; BPM – 20; BMM – 11, 16, 30 e 31 e BF – 17; 25; 26 e 39). “Singletons” foram encontradas em todos os locais avaliados, a maioria destas sequências se agrupou em um clado separado na árvore filogenética (tabela 7, figura 17). O elevado número de “singletons” observados em Bertioga próximo à floresta explica os altos valores de diversidade e riqueza encontrados para este local, uma vez que o índice de Shannon considera o número de “singletons” e equitabilidade para calcular a diversidade de uma dada área (ZHANG et al., 2008), e os estimadores de Chao1 e ACE também levam em consideração o número de “singletons” e “doubletons” (UTOs com duas sequências) ou sequências raras, respectivamente, para avaliar o número de espécies faltantes (CHAO, 1984; CHAO; LEE, 1992). Bordenave et al. (2007) afirmam que a resposta à poluição com óleo pode ser detectada na diversidade de RNAr 16S, uma análise dessas mudanças identificariam e caracterizariam as populações que são rapidamente afetadas (positivamente ou negativamente) pela presença do poluente.

Figura 16 – Distribuição de sequências por UTO em cada biblioteca do solo dos manguezais de Ilha do Cardoso e Bertioga

Figura 17- Árvore filogenética inferida pelo método Neighbor-Joining (Kimura 2-parameter) de sequências parciais de RNAr 16S de cianobactérias de solo dos manguezais de Ilha do Cardoso e Bertioga, baseado em 1000 reamostragens. Valores dentro dos parênteses indicam o número de clones em cada biblioteca; IC- Ilha do Cardoso; B – Bertioga; PM – próximo ao mar, MM – meio do manguezal; PF- próximo à floresta.

Tabela 7 - Distribuição de gêneros, comparação de UTOs, índices de riqueza e diversidade, cobertura estimada para bibliotecas do gene RNAr 16S de cianobacterias de solo localizados em três pontos dos manguezais da Ilha do Cardoso e Bertioga

	ICNS	ICMM	ICPF	BPM	BMM	BPF
<i>Aphanocapsa</i>			1			
<i>Cyanobium</i>	2			3		
<i>Cyanothece</i>		3				4
<i>Synechococcus</i>	10	3	1	13		
<i>Gloeotheca</i>		1				
<i>Prochlorococcus</i>	32	3	2	31		3
Chroococcales	2	1				1
<i>Leptolyngbya</i>		1	1		2	5
<i>Nostoc/Anabaena</i>		2				8
<i>Arthronema</i>			2		2	
<i>Limnothrix</i>			2		1	
<i>Oscillatoria</i>			1			
Oscillatoriales			1		1	
<i>Phormidium</i>			2	1		2
<i>Tolypothrix</i>			1			
<i>Tychonema</i>				1		
<i>Xenococcus</i>						2
Não cultivável	42	74	72	40	84	56
Sequências	88	88	86	89	90	81
UTOs	21	22	33	20	17	51
Shannon	2,52(2,76-2,27)	2,02(2,32-1,71)	2,48(2,80 - 2,16)	2,23(2,47 - 1,99)	1,77 (2,04 - 1,50)	3,47(3,71 - 3,24)
Chao1	85,00(241,16-41,65)	52,33(134,43 - 30,18)	98,00(219,52 - 55,65)	38,33(95,08- 24,47)	44,50(130,49- 23,66)	324,33(825,08 - 147,51)
ACE	63,96(136,29 - 38,64)	46,98(106,32 - 29,40)	154,05(393,15 - 73,68)	42,58(97,08- 26,61)	54,33(171,56 - 26,01)	260,92(553,32 - 138,73)
ICE(%)	89,80	84,60	71,70	88,30	88,40	56,80
Singletons	9	8	12	7	4	21

Uma cianobactéria não cultivável, denominada UCYN-A, de grande abundância e globalmente distribuída, apresentou uma grande importância na entrada de nitrogênio em oceanos. A metodologia de separação de célula por citometria de fluxo juntamente com tecnologias de sequenciamento (pirosequenciamento), possibilitou o conhecimento do genoma deste organismo (DeLONG, 2010; MOISANDER, et al., 2010; TRIPP et al., 2010). Este resultado volta a confirmar o grande potencial presente nos micro-organismos não cultiváveis, os quais foram os mais abundantes no presente estudo.

Contudo, o dado mais intrigante foi que a maioria das sequências de RNAr 16S obtidas nos locais meio do manguezal e próximo à floresta em Bertioga tiveram identidade menores que 90% com as sequências disponíveis no GenBank. Uma hipótese de que as mudanças ambientais promovidas pelo evento de contaminação pode ter favorecido o crescimento e a permanência de espécies antes suprimida pela existência de espécies adaptadas em ambientes prístinos pode surgir a partir deste achado. Silva (2010) sequenciou cerca de 1400 pares de bases do gene RNAr 16S de quatro linhagens isoladas do manguezal de Bertioga do ponto próximo à floresta, sendo que uma das linhagens (CENA150) apresentou apenas 92% de identidade com as sequências depositadas no GenBank.

Ward (2006) e Ward et al. (2006) descrevem como “ecotipo” populações com distribuição única ao longo de gradientes ecológicos, sendo populações que ocupam nichos exclusivos e variam unicamente em resposta a mudanças nas variáveis ambientais. Cohan (citado por Ward, 2006) aponta que uma série de seleções periódicas pode atuar como uma força coesiva aprisionando uma população dentro de um nicho, com os sobreviventes de cada seleção periódica passando seu genoma completo, incluindo todos os genes de definem a habilidade para ocupar tal nicho.

Segundo a suposição de Martinus Beijerinck de cerca de um século atrás, citada por vários autores (OREN 2004; PAPKE et al., 2003; STAHL; HULLAR; DAVIDSON, 2006; ZHANG; KI; QIAN, 2008), que “tudo está em todos os lugares, o ambiente que seleciona”, fornece suporte para avaliar a diversidade microbiana e descrever padrões de biogeografia demonstrado pelos micro-organismos em grande escala espacial (FIERER et al., 2007), sugerindo que barreiras geográficas não restringem a dispersão de bactérias. Neste sentido, a dispersão de bactérias é unicamente determinada pela dispersão global de populações pré-adaptadas. Esta

visão foi primeiramente baseada na divergência do gene 16S RNAr, o qual pode não ser representativo de mudanças em outros genes que definem traços de adaptação específica. (STAHL; HULLAR; DAVIDSON 2006).

2.4.2.2 ARISA e TRFLP do gene *nifH*

Os solos coletados nos manguezais de Ilha do Cardoso e Bertioga nos anos de 2007, 2008 e 2009 foram avaliados e comparados pela metodologia de ARISA para as populações de cianobactérias e bactérias e TRFLP do gene *nifH* para acessar o grupo de diazotróficos.

Soo (2007) e Barbier (2009) usaram a metodologia de ARISA para avaliar as populações de cianobactérias e de bactérias residentes em amostras de solo coletadas, em uma região geotermal e em uma área de deserto livre de gelo, respectivamente, no continente Antártico. A primeira autora concluiu que a temperatura e o pH foram os principais fatores que afetaram estas populações. Já a segunda autora infere que a combinação entre temperatura, disponibilidade de água e litologia criam nichos apropriados para a sobrevivência dos micro-organismos.

Pela metodologia ARISA, neste estudo foi possível identificar um total de 412 picos diferentes para cianobactérias, sendo a variação de tamanho dos fragmentos entre 304 a 997 pares de bases. Já no caso do grupo de bactérias um total de 473 picos diferentes foi identificado, variando em tamanho entre 301 e 997 pares de bases. Em média não foi possível observar diferenças entre o número de picos de ARISA dentro de cada população nos diferentes locais amostrados em ambos os manguezais (figura 18).

Figura 18 - Número de picos de ARISA de cianobactérias e bactérias obtidos em cada ponto amostrado nos diferentes manguezais. IC- Ilha do Cardoso; B-Bertioga; PM-próximo ao mar; MM-meio do manguezal; PF-próximo à floresta.

Os resultados obtidos avaliando-se os perfis de ARISA pela análise multivariada (CA) sugerem que a composição das populações de cianobactérias e de bactérias é distinta entre os manguezais avaliados (figura 19) e parece ser dependente do gradiente de salinidade gerado pelo regime de marés também, não foi observada influência entre os anos de coletas nestes casos.

Figura 19 - Diagrama de ordenação de Análise de Correspondência (CA) para o perfil de ARISA, A) cianobactéria and B) bactéria

As comunidades de cianobactérias e de bactérias presentes na Ilha do Cardoso mostraram uma clara separação de acordo com os locais de coleta (tabela 8 e figura 20), embora esta relação seja mais evidente na população de cianobactérias (figura 20a) do que em bactérias (figura 20b), quando ambos os grupos são comparados pelo coeficiente de Spearman um alto

valor de correlação é obtido ($p=0,577$), indicativo de que existe uma padrão similar, e estas populações respondem de maneira semelhante às variações ambientais ocorridas neste ambiente.

Tabela 8 - Análise de similaridade [ANOSIM valor R (p)] dos perfis de ARISA de populações de cianobactéria e bactéria comparando os locais de coleta nos manguezais Ilha do Cardoso e Bertioga

Local	IC-ciano	IC-bactéria	B-ciano	B-bactéria
PMxMM	0,699(0,001)	0,206(0,009)	0,249(0,026)	0,398(0,003)
PMxPF	0,878(0,001)	0,774(0,001)	0,519(0,001)	0,396(0,001)
MMxPF	0,946(0,001)	0,712(0,001)	0,052(0,22)	0,025(0,013)

IC-Ilha do Cardoso; B- Bertioga; PM-próximo ao mar; MM-meio do manguezal; PF-próximo à floresta

Dias et al. (2010) ao avaliar pela metodologia de DGGE a comunidade de bactérias presentes no solo do manguezal da Ilha do Cardoso, verificaram que a análise de agrupamento revelou a presença de grupos de bactérias de acordo com o local dentro do manguezal. Ainda, esta população variou conforme a profundidade do solo coletada e a estação do ano. Os autores inferem que considerando a salinidade, as marés e mudanças no conteúdo de matéria orgânica e nutrientes, seja aceitável de se encontrar alterações nas comunidades dentro das localidades amostradas no manguezal. Outros trabalhos também apontam a influência da salinidade e das marés como fatores determinantes na diversidade bacteriana em manguezais. (GONZALEZ-ACOSTA et al., 2006; HENRIQUES et al., 2006), bem como em lagos hipersalinos (JIANG et al., 2007; JUNGBLUT et al., 2005). Existe uma indicação de que a salinidade também exerce um efeito marcante sobre o metabolismo e crescimento de cianobactérias (SELLNER; LACOUTURE; PARRISH, 1988), cianobactérias unicelulares aumentam em abundância e varia sua composição de acordo com o aumento da salinidade do ambiente (NÜBEL et al., 2000). Estes mesmos autores colocam que este padrão pode estar correlacionado com a competição e predação por outros organismos em locais com menor pressão ambiental.

Figure 20 - Análise de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) para o perfil de ARISA de amostras de solo do manguezal da Ilha do Cardoso. A) cianobactéria e B) bactéria

Por outro lado, o mesmo padrão de agrupamento não foi observado quando comparadas às comunidades de cianobactérias e bactérias existentes nas amostras de Bertioga (figura 21). Este fato pôde ser confirmado pela análise de similaridade (ANOSIM – tabela 8), sendo que as populações presentes tanto no ponto de coleta no meio do manguezal quanto próximo à floresta não se separam claramente como ocorrido para Ilha do Cardoso, para ambos os grupos. ANOSIM é um método estatístico que permite avaliar diferenças entre grupos em um conjunto de dados multivariados. Esta análise produz valor estatístico, R , que representa o nível de separação entre os grupos teste (CLARK, 1993). Um valor próximo a um (1) indica que a composição da

comunidade é totalmente diferente, enquanto que valores próximos a zero (0) demonstram a similaridade entre os grupos (CLARKE; GORLEY, 2006).

Figure 21 - NMDS para o perfil de ARISA de amostras de solo do manguezal de Bertioga. A) cianobactéria e B) bactéria

Cury (2002) e Nunes (2006) avaliaram a população de bactérias presentes no solo do manguezal de Bertioga nos pontos contaminados por petróleo. Assim como neste trabalho, os autores verificaram que não existe diferença na população deste micro-organismo em detrimento da localização dos pontos de coleta, os quais se referem aos pontos meio do manguezal e próximo

à floresta deste estudo. Dias¹ ao avaliar bactérias e archaeas, presentes nos mesmos pontos de coleta deste trabalho por DGGE, verificou o mesmo padrão de distribuição, ou seja, existe um agrupamento das amostras coletadas nos pontos contaminados separado do local próximo ao mar, em ambos os grupos. Mantos microbianos contaminados com petróleo induzem mudanças na biodiversidade de cianobactérias, aumentando o crescimento de formas mais tolerantes (LLIRÓS et al., 2003).

Assim o legado de contaminação por óleo ocorrido em 1983 pode ter mascarado os efeitos de habitats (gradiente de salinidade) entre os locais de coleta. Entretanto, quando ambos os grupos (ciano e bactéria) são comparados pelo coeficiente de correlação de Spearman um baixo valor é observado ($p=0.179$), indicativo de que cianobactéria e bactéria apresentam diferentes respostas quando expostas a esse tipo de contaminação.

Contudo, como para o DGGE, a metodologia ARISA possibilitou discriminar entre as populações residentes nos manguezais avaliados, sendo que ambas as metodologias são congruentes para os dados apresentados. Reforçando a idéia de que o gradiente de salinidade promovido pelo regime de marés no manguezal da Ilha do Cardoso se demonstra como condição determinante na distribuição das populações dos grupos de micro-organismos estudados. Ainda provavelmente, exerce forças que modulam similarmente as populações de cianobactérias e bactérias neste ecossistema, uma vez que a resposta para os dois grupos é dirigida principalmente pela diferenciação entre os pontos de coletas amostrados dentro do manguezal, não havendo influência do tempo de coleta. A associação entre cianobactérias e bactérias, em ambientes extremos, fortemente sugere que estes organismos trocam nutrientes, bem como favorecem a formação de um ambiente hospitaleiro para que ocorram processos sensíveis ao O₂, assim como a fixação de N₂ (OLSON et al., 1998).

A diversidade da população diazotrófica em ambientes aquáticos tem sido estudada pela abordagem de biblioteca do gene *nifH* por vários autores, como em ambientes de água doce (BAUER, 2008; KIRSHTEIN; PAERL; ZEHR, 1991; YANNARELL; STEPPE; PAERL, 2006), águas marinhas (FALCÓN et al., 2002; FALCÓN et al., 2004; LANGOIS, LaROCHE, RAAB

¹ Informação pessoal.

2005; MAZARD et al., 2004; ZEHR et al., 1995; ZEHR et al., 2001; ZEHR; MELLON; ZANI, 1998), e também em solo (OLSON et al., 1998; RÖSCH; MERGEL; BOTHE, 2002; WIDMER et al., 1999). O fato de que indivíduos dos domínios bactéria e archaea possuírem o agrupamento gênico para nitrogenase indicam a existência de redundância funcional (NAEEM; LI, 1997; ROSENFELD, 2002; WOHL; ARORA; GLADSTONE, 2004). A redundância funcional pode permitir às comunidades microbianas manter redes de fluxos respondendo a perturbações naturais e interferir na resiliência do ecossistema (YANNARELL; STEPPE; PAERL, 2007).

Em manguezais a colonização por diazotróficos tem sido amplamente estudada em raízes de plantas (por ex. pneumatóforos) (BASHAN et al., 1998; FLORES-MIRELES, WINANS, HOLGUIN, 2007; RAMESHKUMAR et al., 2008; RAMESHKUMAR; NAIR, 2009; ROJAS et al., 2001; ZUBERER; SILVER, 1979), enquanto que estudos em solos ocorrem em menor número (ONWURAH, 1999; TAKETANI et al., 2009).

Figura 22 - Análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) da população de micro-organismos fixadores de nitrogênio, de solos de três pontos de coleta do manguezal da Ilha do Cardoso SP, avaliados pela metodologia de T-RFLP, PM- próximo ao mar, MM- meio do manguezal e F-próximo à floresta.

A população de micro-organismos fixadores de nitrogênio foi avaliada pela metodologia de TRFLP utilizando o gene *nifH*, e foi possível observar que no manguezal da Ilha do Cardoso ocorre a formação de dois subgrupos pela análise de agrupamento NMDS, sendo que as amostras coletadas próximo ao mar e no meio do manguezal se agruparam e que a região com população mais distinta é o ponto próximo à floresta (figura 22 – quadrados azuis). Este resultado pode ser influenciado pela elevada colonização dos dois primeiros pontos pelos gêneros *Synechococcus*, como verificado pela biblioteca do gene RNAr 16S. Como mencionado anteriormente, estes organismos são responsáveis por grande parte da fixação biológica do nitrogênio em ambiente marinho, e contribuem com uma grande fração da demanda de nitrogênio disponível (ZEHR et al., 2000). Estimativas da concentração celular e da fixação de nitrogênio por estes organismos na estação ALOHA indicam que eles podem igualar ou até mesmo exceder a contribuição de indivíduos do gênero *Trichodesmium*, que até então era descrito como o principal na fixação de N₂ em oceanos (ZEHR et al., 2001; ZEHR; WARD, 2000). Falcón et al. (2004) verificaram que cianobactérias unicelulares obtêm o ATP necessário para realizar a fixação do nitrogênio durante o dia pela fotossíntese e separa temporalmente a produção de O₂ da atividade da nitrogenase. Proteobactérias são heterotróficas e ambientes microanaeróbicos podem ocorrer ao redor das células que estão respirando, o que pode fornecer um ambiente favorável para a fixação do N₂ durante o dia. No caso dos manguezais, a condição de baixo oxigênio é favorecida pelo constante alagamento do solo. Ainda a salinidade pode também influenciar a colonização dos micro-organismos fixadores de nitrogênio (JONES, 1974; LEHTIMÄKI, 1997).

Já ao se avaliar o mesmo grupo no manguezal de Bertioga não se observa um padrão de agrupamento entre os diferentes locais de coleta. Porém verifica-se uma tendência de agrupamento para as regiões próximo ao mar e no meio do manguezal em conjuntos distintos (figura 23 – destaque). No entanto, os pontos avaliados para a localidade próxima à floresta não apresenta um padrão definido, de maneira que os pontos aparecem distribuídos pela área do gráfico (figura 23 – quadrados azuis). Taketani et al. (2009) verificaram que manguezais contaminados por petróleo apresentam uma colonização de bactérias fixadores de nitrogênio diferente de ambientes prístinos e que a entrada desse nutriente nestes locais se devem principalmente pela fixação biológica do nitrogênio.

Figura 23 - Análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) da população de micro-organismos fixadores de nitrogênio, de solos de três pontos de coleta do manguezal de Bertioga SP, avaliados pela metodologia de T-RFLP, PM- próximo ao mar, MM- meio do manguezal e F-próximo à floresta.

RFLP foram utilizados para se discriminar a população de diazotróficos em solos com diferentes tratamentos como: agricultura, fertilização, pesticidas, pastagens e com diferentes coberturas de plantas, sendo considerada uma ótima ferramenta para comparar a diversidade desses micro-organismos (POLY et al., 2001).

Zhang et al. (2008) avaliaram por DGGE a população de diazotróficos em sedimentos de manguezal da China e verificaram que a concentração de potássio disponível, bem como, a quantidade de matéria orgânica foram fatores fundamentais para a variabilidade da composição da comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio. Cianobactérias bem adaptadas a condições salinas foram encontradas ao se avaliar por biblioteca a comunidade diazotrófica em reservatório salinos, e as mesmas são capazes de manter a população viável em estações de seca e chuva (YANNARELL; STEPPE; PAERL, 2006).

Sendo assim, a população de diazotróficos responde de maneira peculiar de acordo com as condições ambientais onde ela se encontra.

3 Considerações Finais

Um grande desafio para os microbiologistas é entender a distribuição dos micro-organismos na natureza em relação à suas habilidades fisiológicas. Apesar do progresso tecnológico na área de ciências biológicas, a falta de informação sobre a estrutura e diversidade de cianobactérias em ecossistemas de manguezais é marcante.

Sendo assim, pode-se inferir que:

- Verificou-se diferença entre as espécies que habitam as folhas das diferentes árvores; no entanto a localização das árvores dentro do manguezal mostra ter maior influência na colonização da filosfera do que as espécies de árvores.
- Observou-se que *Laguncularia* apresenta maior riqueza de espécies em sua filosfera, enquanto que *Avicennia* apresenta menores valores de riqueza e diversidade.
- Em folhas houve a predominância de gêneros pertencentes às ordens Oscillatoriales e Nostocales; todavia, foi observado que em número de sequências ocorreu uma dominância de representantes da ordem Stigonematales.
- Verificou-se que as populações de cianobactérias residentes em solos dos manguezais de Ilha do Cardoso e Bertioga são distintas; porém, amostras coletadas próximas ao mar aparentam ser semelhantes quanto à colonização por cianobactérias.
- As análises químicas demonstraram que os fatores como concentração de sódio, magnésio e condutividade elétrica exercem uma grande influência sobre o ponto próximo ao mar em ambos os manguezais analisados.
- Os resultados indicaram que os menores valores de riqueza foram observados próximo ao mar em ambos os manguezais, e maiores na localidade próxima à floresta.

- Foi possível acessar 17 gêneros de cianobactérias residentes em solos dos manguezais.
- A maioria das sequências de RNAr 16S obtidas nos locais meio do manguezal e próximo à floresta em Bertioga tiveram identidade menores que 90% com as sequências disponíveis no GenBank.
- Os dados de ARISA corroboraram com os observados pela metodologia de DGGE, onde os manguezais são distintos quanto à colonização por cianobactérias.
- Ao comparar cianobactérias com bactérias que colonizam o solo do manguezal da Ilha do Cardoso foi possível verificar que existem semelhanças nas distribuições entre os locais de coleta e que ambas as populações respondem de maneira similar às variações ambientais ocorridas neste ecossistema.
- Em Bertioga as populações presentes tanto no ponto de coleta no meio do manguezal quanto próximo à floresta não se separam claramente.
- Observou-se que no manguezal da Ilha do Cardoso as amostras coletadas próximo ao mar e no meio do manguezal abrigam micro-organismos fixadores de nitrogênio semelhantes, e a região com população mais distinta é o ponto próximo à floresta.
- A população de diazotróficos de Bertioga demonstrou ser distinta entre os pontos próximo ao mar e meio do mangue; entretanto, não foi possível notar um padrão definido para a localidade próxima à floresta.
- Este estudo permitiu acessar um grande número de sequências de RNAr 16S de cianobactérias ainda não publicadas no banco de dados, tanto de organismos colonizadores de folhas como de solo.

REFERÊNCIAS

- ABRIL, A.B.; TORRES, P.A.; BUCHER, E.H. The importance of phyllosphere microbial populations in nitrogen cycling in the Chaco semi-arid woodland. **Journal of Tropical Ecology**, New York, v. 21, p.103–107. 2005.
- AGUIAR, R.; FIORE, M.F.; FRANCO, M.W.; VENTRELLA, M.C.; LORENZI, A.S.; VANETTI, C.A.; Alfenas, A.C. A novel epiphytic cyanobacterial species from the genus *Brasilonema* causing damage to Eucalyptus leaves. **Journal of Phycology**, New York v. 44, p.1-13, 2008.
- ALONGI, D.M.; CHRISTOFFERSEN, P.; TIRENDI, F. The influence of forest type on microbial-nutrient relationships in tropical mangrove sediments. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 17, p.1201–1223, 1993.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, 59, 143–169. 1995.
- AQUINO, M.C. A importância biológica do mangue. **Apicultura no Brasil**, São Paulo, v.4, p.8, 1987.
- ASHELFORD, K.E.; CHUZHANOVA, N.A.; FRY, J.C.; JONES, A.J.; WEIGHTMAN, A.J. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n. 12, p. 7724-7736, 2005.
- BARBIER, B.A. **Investigating the Biodiversity of Microbial Communities in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica: An Inter-Valley Comparison Study**. 2009. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade de Waikato, Nova Zelândia. 2009.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. **Trees**, Berlin, v. 16, p. 159-166, 2002.
- BASHAN, Y.; PUENTE, M.E.; MYROLD, D.D.; TOLEDO, G. In vitro transfer of fixed nitrogen from diazotrophic filamentous cyanobacteria to black mangrove seedlings. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 26, p. 165-170, 1998.
- BAUER, K.; DÍEZ, B.; LUGOMELA, C.; SEPPÄLÄ, S.; BORG, A.J.; BERGMAN, B. Variability in benthic diazotrophy and cyanobacterial diversity in a tropical intertidal lagoon. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 63, p. 205–221, 2008.
- BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; FALKOWSKI, P. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 154, p.157–164, 2003.

- BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 7, p. 1513-1523, 1979.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrilamde Gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BONIN, P.; GILEWICZ, M.; RAMBELOARISOA, E.; MILLE, G.; BERTRAND, J.C. Effect of crude oil on denitrification and sulfate reduction in marine sediment. **Biogeochemistry**, Washington, v. 10, p. 161-174, 1990.
- BORDENAVE, S.; GOÑI-URRIZA, M.S.; CAUMETTE, P.; DURAN, R. Effects of Heavy Fuel Oil on the Bacterial Community Structure of a Pristine Microbial Mat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 19, p. 6089-6097, 2007.
- BRANCO, L.H.Z.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; SORMUS, L. Cyanophyte flora from Cardoso Island mangroves, São Paulo State, Brazil. 2. Oscillatoriales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 84, p.39-52, 1997.
- BRANCO, L.H.Z.; MOURA, A. do N.; SILVA, A.C. da; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. Biodiversidade e considerações biogeográficas das cyanobacteria de uma área de manguezal do estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 17, p. 585-596, 2003.
- BRANCO, L.H.Z.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; SORMUS, L. Cyanophyte flora from Cardoso island mangroves, São Paulo State, Brazil. 1. Chroococcales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 80, p. 101-113. 1996a.
- BRANCO, L.H.Z.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; SORMUS, L. Cyanophyte flora from Cardoso island mangroves, São Paulo stat, Brazil. 2. Oscillatoriales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 584, p.39-52. 1996b.
- BRANCO, L.H.Z.; SILVA, S.M.F.; SANT'ANNA, C.L. Stichosiphon mangle sp. nova, a new Cyanophyte from mangroves environments. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 72, p. 1-7. 1994.
- BREMNER, J.M.; KEENEY, D.R. Determination and isotope-ratios analysis of different forms of nitrogen in soils: 3. Exchangeable ammonium, nitrate and nitrite by extraction-distillation methods. **Soil Society of America Proceedings**, Madison, v.30, p.577-582, 1996.
- BRESLAUER, K.J.; FRANK, R.; BLOCKER, H.; MARKY, L.A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, Washington, v. 83, p. 3746-3750, 1986.
- BROCK, T.D. Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. **Science**, Washington, n. 179, p. 480-483, 1973.
- BROWN, M.V.; FUHRMAN, J.A. Marine bacterial microdiversity as revealed by internal transcribed spacer analysis. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf, n. 41, p. 15-23, 2005.

BROWN, M.V.; SCHWALBACH, M.S.; HEWSON, I.; FUHRMAN, J.A. Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 1466–1479, 2005.

BULL, A.T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 46, p. 219-252, 1992.

BURNS, K.A.; GARRITY, S.D.; JORISSEN, D.; Mac PHERSON, J.; STOELTING, M.; TIERNEY, J.; YELLE-SIMMONS, L. The Galeta oil spill; II, Unexpected persistence of oil trapped in mangrove sediments. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 38, n. 4, p. 349-364, 1994.

CANOVA, S.P. **Diversidade e bioprospecção de actinobactérias isoladas de manguezais**. 2009. 66 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

CARTER, N. Algal flora of two salt marshes. **The Journal of Ecology**, cidade, v. 21, p. 128-208, 1933.

CHAO, A. Nonparametric Estimation of the number of the classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, Oxford, v. 11, p. 265-270, 1984.

CHAO, A.; LEE, S.M. Estimating the Number of Classes via Sample Coverage. **Journal of the American Statistics Association**, New York, v. 87, p.210-217, 1992.

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

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. **PRIMER 6.0: User Manual/Tutorial**. PRIMER-E, Plymouth, 2006.

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

CLOUGH, B. F. Growth and Salt Balance of the Mangroves *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. and *Rhizophora stylosa* Griff. in relation to Salinity. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 11, p.419-30, 1984.

CURTIS, T.P.; SLOAN, W.T. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 7, p.221–226, 2004.

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

CURY, J.C. **Diversidade de Bacteria e Archaea em solos de mangue e marisma**. 2006. 148p. Tese (Doutorado em Agronomia). - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

DAS, S.; LYLE, P.S.; KHAN, S.A. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. **Current Science**, Bangalore, v. 90, n. 10, p. 1325-1335, 2006.

DECHO, A.W. Microbial Biofilms in Intertidal Systems: An Overview. **Continental Shelf Research**, New York, v. 20, p. 1257-1273, 2000.

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

DeLONG, E. F. Interesting things come in small packages. **Genome Biology**, London, v.11, n.118, p.1-4, 2010.

DeLONG, E.F.; PACE, N.A. Environmental diversity of bacteria and archaea. **Systematic Biology**, Washington, D.C., v. 50, n 4, p. 470-478, 2001.

DIAS, A.C.F. **Diversidade de bactérias do sedimento de manguezal da Ilha do Cardoso Cananéia** – São Paulo, 2008. 61p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto Butantan/Instituto de Pesquisa Tecnológica, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D.; RIGONATO, J.; FIORE, M.F.; MELO, I.S.; ARAÚJO, W.L. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, DOI 10.1007/s10482-010-9471-z, 2010.

DITTMAN, E.; NEILAN, B.A.; BÖRNER, T. Molecular Biology of the Peptide and Polyketide Biosynthesis in Bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 57, p. 467-473. 2001.

DOR, I. Epiphytic blue-green algae (Cyanobacteria) of the Sinai mangal: consideration on vertical zonation and morphological adaptation. In: POR, F. D.; DOR, I. (Ed.). **Hydrobiology of the mangal**, Boston:Junk Publisher, 1984. p. 33-54.

ECHEVESTE, P.; AGUSTÍ, S.; DACHS, J. Cell size dependent toxicity thresholds of polycyclic aromatic hydrocarbons to natural and cultured phytoplankton populations. **Environmental Pollution**, Barking, v. 158, p. 299–307, 2010.

ELBELTAGY, A.; ANDO, Y. Phylogenetic analysis of *nifH* gene sequences from nitrogen-fixing endophytic bacteria associated with the roots of three rice varieties **Journal of Food, Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 3, n. 1, p. 237-242, 2005.

El-BESTAWY, E.A.; El-SALAM, A.Z.A.; El-RAHMAN, A.; MANSY, H. Potential use of environmental cyanobacterial species in bioremediation of lindane-contaminated effluents. **International Biodeterioration e Biodegradation**, New York, v. 59, p. 180–192, 2007.

EMBRAPA, 1997. **Manual de Métodos de Análise de Solo**. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, Rio de Janeiro. 212 p.

EVERETT, K.R. Histosols In: WILDING, L.P.; SMECK, N.E.; HALL, G.F. (eds) **Pedogenesis and Soil Taxonomy. The Soil Orders**, Amsterdam: Elsevier Science Publishers B., v. 2, p 1-53. 1983.

FALCÓN, L.I.; CIPRIANO, F.; CHISTOSERDOV, A.Y.; CARPENTER, E.J. Diversity of diazotrophic unicellular cyanobacteria in the tropical north atlantic ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 11, p. 5760–5764, 2002.

FALCÓN, L.I.; CARPENTER, E.J.; CIPRIANO, F.; BERGMAN, B.; CAPONE, D.G. N₂ Fixation by Unicellular Bacterioplankton from the Atlantic and Pacific Oceans: Phylogeny and In Situ Rates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n 2, p. 765–770, 2004.

FELLER, I. C.; SITNIK, M. (Ed.) **Mangrove Ecology Workshop Manual** Washington DC: Smithsonian Institution. 1996. 135p.

FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, Berlin, v. 39, p.783-791, 1985.

FELSKE, A.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; AKKERMANS, A.D.L. Application of temperature-gradient gel electrophoresis in taxonomy of coryneform bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, n. 49, p. 113-121, 1999.

FIELD, C.B.; OSBORN, J.G.; HOFFMAN, L.L; POLSENBERG, J.F.; ACKERLY, D.D.; BERRY, J.A.; BJORKMAN, O.; HELD, A.; MATSON, P.A.; MOONEY, H.A. Mangrove biodiversity and ecosystem function. **Global Ecology and Biogeography Letters**, Oxford, v. 7, p. 3-14, 1998.

FIERER, N.; MORSE, J.L.; BERTHRONG, S.T.; BERNHARDT, E.S.; JACKSON, R.B. Environmental controls on the landscape-scale biogeography of stream bacterial communities. **Ecology**, Durham, v. 88, n. 9, p. 2162–2173, 2007.

FIGLIORE, M.F.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; KOMÁREK, J.; KASTOVSKY, J. SULEK, J.; LORENZI, A.S. The cyanobacterial genus *Brasilonema*, gen. Nov., a molecular and phenotypic evaluation. **Journal of Phycology**, New York, v. 43, p.789–798, 2007.

FIGLIORE, M.F.; HONDA, R.Y. Fixação do N₂ por cianobactérias. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. **Microrganismos e Agrobiodiversidade**. Guaíba: Agrolivros, 2008. v.1, p.69-96.

FISHER, M.M.; TRIPLETT, E.W. Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4630–4636, 1999.

FLORES-MIRELES, A.L.; WINANS, S.C.; HOLGUIN, G. Molecular Characterization of Diazotrophic and Denitrifying Bacteria Associated with Mangrove Roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 22, p. 7308–7321, 2007.

FLORES-VERDUGO, F.; GONZÁLEZ-FARÍAS, F.; RAMÍREZ-FLORES, O.; AMEZCUA-LINARES, F.; YÁÑEZ-ARANCIBIA, A.; ALVAREZ-RUBIO, M.; DAY JR, J.W. Mangrove Ecology, Aquatic Primary Productivity, and Fish Community Dynamics in the Teacapfin-Agua Brava Lagoon-Estuarine System (Mexican Pacific). **Estuaries**, Columbia, v. 13, n. 2, p. 219-230, 1990.

FORNEY, L.J.; ZHOU, X.; BROWN, C.J., Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. **Current Opinion in Microbiology**. London, v. 7, p. 210–220 2004.

FOX, G.E.; WISOTZKEY, J.D.; JURTSCHUK, P.J. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, n. 42, p. 166–170, 1992.

FREIBERG, E. Microclimatic parameters influencing nitrogen fixation in the phyllosphere in a Costa Rican premontane rain Forest. **Oecologia**, Berlin, v. 17, p.9-18. 1998.

FRUEHAUF, S.P. **Rhizophora mangle (Mangue Vermelho) em áreas contaminadas de manguezal da baixada santista**. 2005. 223p. Tese (Doutorado em Ecologia de Agrossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

FÜRNKRANZ, M.; WANEK, W.; RICHTER, A.; ABELL, G.; RASCHE, F. Nitrogen Fixation by Phyllosphere Bacteria Associated with Higher Plants and Their Colonizing Epiphytes of a Tropical Lowland Rainforest of Costa Rica. **ISME Journal**, London, v. 2, p.561-570, 2008.

GARCIA-PITCHEL, F.; PRUFERT-BEBOUT, L.; MUYZER, G. Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3284-3291, 1996.

GAUTHEYROU, M.P.J. **Handbook of Soil Analysis: Mineralogical, Organic and Inorganic Methods**. Netherlands, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. 995 p.

GENUÁRIO D.B. **Cianobactérias em ecossistemas de manguezais: isolamento, morfologia e diversidade genética**. 2010. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2010.

GIOVANNONI, S.J.; STINGL, U. Molecular diversity and ecology of microbial plankton. **Nature**, London, v. 437, p. 343-348, 2005.

GOLDEN, S.S.; ISHIURA, M.; JOHNSON, C.H.; KONDO, T. Cyanobacterial circadian rhythms. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p.327– 354, 1997.

GONZÁLEZ, N.; ROMERO, J.; ESPEJO, R.T. Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer region. **Journal of Microbiological Methods**, Netherlands, v. 55, p. 91-97, 2003.

GONZÁLEZ, J.; FIGUEIRAS, F.G.; ARANGUREN-GASSIS, M.; CRESPO, B.G.; FERNÁNDEZ, E.; MORÁN, X.A.G.; NIETO-CID, M. Effect of a simulated oil spill on natural assemblages of marine phytoplankton enclosed in microcosms. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 83, p. 265–276, 2009.

GONZALEZ-ACOSTA, B.; BASHAN, Y.; HERNANDEZ-SAAVEDRA, N.Y.; ASCENCIO, F.; CRUZ-AGUERO, G. 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**, Amsterdam, v. 55, p. 311–321, 2006.

GOTTARDO E.P. **Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas de mangue vermelho (*Rhizophora mangle*) e avaliação do potencial biotecnológico**. 2009. 85 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Butantan/Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

GRAHAM, R.C.; HERBERT, B.E.; ERVIN, J.O. Mineralogy and incipient pedogenesis of Entisols in Anorthosite terrane of the San Gabriel Mountains, California. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 52, p. 738-746, 1988.

GUASP, C.; MOORE, E.R.B.; LALUCAT, J.; BENNASAR, A. Utility of internally transcribed 16S–23S rDNA spacer regions for the definition of *Pseudomonas stutzeri* genomovars and other *Pseudomonas* species. **International Journal Systematics and Evolution Microbiology**, Reading, v. 50, p.1629–1639, 2000.

GUGGER, M.F.; HOFFMANN, L. Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales) **International Journal Systematics and Evolution Microbiology**, Reading, v. 54, p. 349–357, 2004.

HARTMANN, M.; FREY, B.; KÖLLIKER, R.; WIDMER, F. Semi-automated genetic analyses of soil microbial communities: comparison of T-RFLP and RISA based on descriptive and discriminative statistical approaches. **Journal of Microbiological Methods**, Netherlands, v. 61, n. 3, p. 349-360, 2005.

HAVEMANN, S.A.; FOSTER, J.S. Comparative Characterization of the Microbial Diversities of an Artificial Microbialite Model and a Natural Stromatolite. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 23, p. 7410–7421, 2008.

HENRIQUES, I.S.; ALVES, A.; TACÃO, M.; ALMEIDA, A.; CUNHA, A.; CORREIA, A. Seasonal and spatial variability of free-living bacterial community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal). **Estuaries Coastal Shelf Science**, London, v. 68, p.139–148, 2006.

HICKS, B.J.; SILVESTER, W.B. Nitrogen fixation associated with the New Zealand mangrove (*Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. var. *resinifera* (Forst.f.) Bakh.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n. 49, p. 955-959, 1985.

HOFFMANN, L.; GUGGER, M.; ASECIO-MARTINEZ, A. Morphological and molecular characterisation of a stigonematalean cyanobacterium isolated from a Spanish cave. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 109, p. 259-65, 2003.

HUSSAIN, M.I.; KHOJA, T.M. Intertidal and subtidal blue-green algal mats of open and mangroves areas in the Farasan Archipelago (Saudi Arabia), Red Sea. **Botanica Marina**, Berlin, n. 36, p.377-388, 1993.

JIANG, H.; DONG, H.; YU, B.; LIU, X.; LI, Y.; JI, S.; ZHANG, C.L. Microbial response to salinity change in Lake Chaka, a hypersaline lake on Tibetan plateau. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 2603-2621, 2007.

JONES, K. Nitrogen fixation in a salt marsh. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 62, n. 2, p. 553-565, 1974.

JONES, S.E.; SHADE, A.L.; McMAHON, K.D.; KENT, A.D. Comparison of Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) of Aquatic Bacterial Communities: An Ecological Perspective. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, doi:10.1128/AEM.02130-06. 2006.

JUHASZ, A.L.; NAIDU, R. Bioremediation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review of the Microbial Degradation of Benzo[a]Pyrene. **International Biodeterioration e Biodegradation**, New York, v. 45, p. 57-88, 2000.

JUNGBLUT, A.D.; HAWES, I.; MOUNTFORT, D.; HITZFELD, B.; DIETRICH, D.R.; BURNS, B.P.; NEILAN, B.A. Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 519-529, 2005.

KARL, D.; MICHAELS, A.; BERGMAN, B.; CAPONE, D.; CARPENTER, E.; LETELIER, R.; LIPSCHULTZ, F.; PAERL, H.; SIGMAN, D.; STAL, L. Dinitrogen fixation in the world's oceans. **Biogeochemistry**, Washington, v. 57, n. 58, p. 47-98, 2002.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B.L. Biology of Mangroves and Mangrove Ecosystems. **Advances in Marine Biology**, New York, v 40, p.81-251, 2001.

KATHIRESAN, K.; QASIM, S.Z. **Biodiversity of Mangrove Ecosystem**; Hindustan Publishing: New Delhi; 2005. 251 p.

KELLY, K.M.; CHISTOSERDOV, A.Y. Phylogenetic analysis of the succession of bacterial communities in the Great South Bay (long Island). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 35, n.1, p. 85-95. 2001.

KENT, A.D.; YANNARELL A.C.; RUSAK J.A.; TRIPLETT, E.W.; MCMAHON, K.D. Synchrony in aquatic microbial community dynamics. **The ISME Journal**, London, v. 1, p. 38–47, 2007.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide-sequences. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 16, p. 111–120, 1980.

KIRSHTEIN, J.D.; PAERL, H.W.; ZEHR, J. Amplification, Cloning, and Sequencing of a nifH Segment from Aquatic Microorganisms and Natural Communities **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 9, p. 2645-2650, 1991.

KOKSHAROVA, .A.; WOLK, C.P. Genetic tools for cyanobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.58, p.123-137, 2002.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota, 1. Teil: Chroococcales. In: ETTL, H; GÄRTNER, G.; HEYNIG, H.; MOLLENHAUER, D. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Stuttgart: Gustav Fisher, 1999. v. 19/1, p. 548.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. 2. Teil: Oscillatoriales. In: BÜDEL, B.; KRIENITZ, L.; GÄRTNER, G.; SCHAGERL, M. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Munique: Elsevier GmbH, 2005. v. 19/2, p. 1- 759.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern Approach to the Classification System of Cyanophytes 4. Nostocales. **Archives of Hydrobiology Supplement**, New York, v. 82, p. 247-345, 1989.

KOSTER, J. T. Caribbean brackish and freshwater Cyanophyceae. **Blumea**, Leiden, v. 10, p.323-366, 1960.

KRINGS, M.; HASS, H.; KERP, H.; TAYLOR, T.N.; AGERER, R.; DOTZLER, N. Endophytic cyanobacteria in a 400-million-yr-old land plant: A scenario for the origin of a symbiosis? **Review of Palaeobotany and Palynology**, Amsterdam, doi:10.1016/j.revpalbo.2008.06.006, 2008.

KROPF, S.; HEUER, H.; GRÜNING, M.; SMALLA, K. Significance test for comparing complex microbial community fingerprints using pairwise similarity measures. **Journal of Microbiology Methods**, Netherlands, v. 57, p. 187–195, 2004.

KUCHARSKI, J.; TOMKIEL, M.; BOROS, E.; WYSZKOWSKA, J. The effect of soil contamination with diesel oil and petrol on the nitrification process. **Journal Elementol.** v 15, n. 1, p. 111–118, 2010.

KUMARI, N.; SRIVASTAVA, A.K.; BHARGAVA, P.; RAI, L.C. Molecular approaches towards assessment of cyanobacterial biodiversity. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 18, p. 4284-4298, 2009.

- KUMAZAWA, S.; YUMURA, S.; YOSHISUJI, H. Photoautotrophic growth of a recently isolated N₂-fixing marine non-heterocystous filamentous cyanobacterium, *Symploca* sp. (Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, New York, n. 37, p. 482-487, 2001.
- KWON, S.W.; PARK J.Y.; KIM, J.S.; KANG, J.W.; CHO, Y.H.; LIM, C.K.; PARKER, M.A.; LEE, G.B. Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. **International Journal Systematics and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 263–270, 2005.
- KYARUZI, J.J.; KYEWALYANGA, M.S.; MURUKE, M.H.S. Cyanobacteria composition and impact of seasonality on their in situ nitrogen fixation rate in a mangrove ecosystem adjacent to Zanzibar town Western Indian Ocean. **Journal of Marine Science**, London, n. 2, p. 35-44, 2003.
- LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BÜLL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial Diversity in Tree Canopies of the Atlantic Forest. **Science**, London, v. 312, p. 1917, 2006.
- LAMBERT, G.; STEINKE, T. D.; NAIDOO, Y. Algae associated with mangroves in southern African estuaries: Cyanophyceae. **South Africa Journal of Botany**, Pretoria, v. 55, p. 476-491, 1989.
- LAMPARELLI, C.C.; RODRIGUES, F.O.; MOURA, D.O.de. A long-term assessment of an oil spill in a mangrove forest in São Paulo, Brazil. In: KJERFVE, B.; LACERDA, L.D.; DIOP, S. (Ed.) **Mangrove Ecosystem Studies in Latin America and Africa**, França:UNESCO 1997. p. 191-203.
- LANGOIS, R.J.; LaROCHE, J.; RAAB, P.A. Diazotrophic Diversity and Distribution in the Tropical and Subtropical Atlantic Ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 7910–7919, 2005.
- LEE, D.H.; ZO, Y.G.; KIM, S.J. Non-radioactive method to study genetic profiles of bacterial communities by PCR-single-strand conformation polymorphism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 3112-3120, 1996.
- LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical ecology**. Amsterdam:Elsevier Science BV, 1998. 853p.
- LEHTIMÄKI, J.; MOISANDER, P.; SIVONEN, K.; KONONEN, K. Growth, Nitrogen Fixation, and Nodularin Production by Two Baltic Sea Cyanobacteria **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 5, p. 1647–1656, 1997.
- LEÓN, C.; KUMAZAMA, S.; MITSUI, A. Cyclic appearance of aerobic nitrogenase activity during synchronous growth of unicellular cyanobacteria. **Current Microbiology**, New York, v. 13, p.149–153, 1986.
- LEUKO, S.; GOH, F.; ALLEN, M.A.; BURNS, B.P.; WALTER, M.R.; NEILAN, B.A. Analysis of intergenic spacer region length polymorphisms to investigate the halophilic archaeal diversity of stromatolites and microbial mats. **Extremophiles**, Amsterdam, v. 11, p. 203-210, 2007.

- LINDOW, S.; BRANDL, M. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1875-1883, 2003.
- LIU, W.T.; MARSH, T.L.; CHENG, H.; FORNEY, L.J. Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 11, p. 4516-4522, 1997.
- LLIRÓS, M.; MUNILL, X.; SOLE, A.; MARTINEZ-ALONSO, M.; DIESTRA, E.; ESTEVE, I. Analysis of cyanobacteria biodiversity in pristine and polluted microbia mats in microcosmos by confocal laser scanning microscopy (CLSM). In: MENDEZ-VILAS (Ed.) **Science, technology and education of microscopy: an overview**. London, n 1, v 2, p 483-489. 2003. (FORMATX Microscopy Book Series)
- LORENZI, A.S. **Abordagens moleculares para detectar cianobactérias e seus genótipos produtores de microscistinas presentes nas represas Billings e Guarapiranga, São Paulo, Brasil**. 2004. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- LUKOW, T.; DUNFIELD, P.F.; LIESACK, W. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 32, p. 241-47, 2000.
- MAHASNEH, I.A.; GRAINGER, S.L.J.; WHITTON, B.A. Influence of salinity on hair formation and phosphatase activities of the blue-green alga (Cyanobacterium) *Calothrix viguieri* D253. **British Phycological Journal**, Cambridge, v. 25, n. 1, p. 25-32, 1990.
- MANN, F.D., STEINKE, T.D. Biological nitrogen-fixation (acetylene reduction) associated with decomposing *Avicennia marina* leaves in the Beachwood Mangrove Nature Reserve. **South African Journal of Botany**, Lynnwood Ridge, v. 58, n. 6, p. 533-536, 1992.
- MARIN, V. A.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. Characterization of amplified polymerase chain reaction *glnB* and *nifH* gene fragments of nitrogen fixing *Burkholderia* species. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 36, p. 77-82, 2003.
- MARSH, T.L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, p. 323-327, 1999.
- MASTALLER, M. Destruction of mangrove wetlands-causes and consequences. **Natural Resources and Development**, Tubingen, v.43, n. 44, p. 37-57, 1996.
- MAZARD, S.L.; FULLER, N.J.; ORCUTT, K.M.; BRIDLE, O.; SCANLAN, D.J. PCR Analysis of the Distribution of Unicellular Cyanobacterial Diazotrophs in the Arabian Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.12; p.7355-7364, 2004.

- MENDES, L.W. **Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso-SP**. 2009. 143 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.
- MISRA, H.S.; TULI, T.S. Differential expression of photosynthesis and nitrogen fixation genes in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 122, p. 731–736, 2000.
- MITSUI, A.; CAO, S.; TAKAHASHI, A.; ARAI, T. Growth of synchrony and cellular parameters of the unicellular nitrogen-fixing marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain Miami BG 043511 under continuous illumination. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 69, p. 1–8, 1987.
- MITSUI, A.; KUMAZAMA, S.; TAKAHASHI, A.; IKEMOTO, H.; CAO, S.; ARAI, T. Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. **Nature**, London, v. 323, p.720–722, 1986.
- MOISANDER, P. H.; BEINART, R. A.; HEWSON, I.; WHITE, A. E.; JOHNSON, K. S.; CARLSON, C. A.; MONTOYA, J. P.; ZEHR, J. P. Unicellular cyanobacterial distributions broaden the oceanic N₂ fixation domain. **Science**, Washington, v. 327, n. 5972, p. 1512-1514, 2010.
- MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for indentifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, p. 317-322, 1999.
- MUYZER, G.; de WALL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gel eletrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695-700, 1993.
- NAEEM, S.; LI, S.B. Biodiversity enhances ecosystem reliability. **Nature**, London, v. 390, p. 507–509, 1997.
- NEILAN, B.A.; JACOBS, D.; DEL DOT, T.; BLACKALL, L.L.; HAWKINS, P.R.; COX, P.T.; GOODMAN, A.E. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 47, p. 693-697, 1997.
- NOGUEIRA, N.M.C.; FERREIRA-CORREIA, M.M. Cyanophyceae; Cyanobacteria in red mangrove forest at Mosquitos and Coqueiros estuaries, São Luis, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 61, p. 347-356, 2001.
- NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; CLAVERO, E.; MUYZER, G. Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 217-226, 2000.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 6, p.3327–3332, 1997.

NUNES, G.L. **Diversidade e estrutura de comunidades de bactéria e Archaea em solos de mangue contaminado com hidrocarboneto de petróleo**. 2006 85p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

OHKUMA, M.; NODA, S.; KUDO, T. Phylogenetic Diversity of Nitrogen Fixation Genes in the Symbiotic Microbial Community in the Gut of Diverse Termites **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 11, p. 4926–4934, 1999.

OLSON, J.B.; STEPPE, T.F.; LITAKER, R.W.; PAERL, H.W. N₂-Fixing Microbial Consortia Associated with the Ice Cover of Lake Bonney, Antarctica. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p. 231–238, 1998.

ONWURAH, I.N.E. Role of diazotrophic bacteria in the bioremediation of crude oil-polluted soil. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 74, p. 957-964, 1999.

OREN, A. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1895–1902, 2004.

OROS-SICHLER, M.; COSTA, R.; HEUER, H.; SMALLA, K. Molecular fingerprinting techniques to analyze soil microbial communities. In: van ELSAS, J. D.; JANSSEN, J.; TREVORS, J. (Ed.), **Modern Soil Microbiology** 2nd ed., Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis. 2007. p. 355-386.

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

OSBORNE, B.; BERGMAN, B. Commentaries on cyanobacterial symbioses: introduction and overview. **Biology and Environment: Proceedings Of The Royal Irish Academy**, Dublin, v. 102B, p. 1–2, 2002.

PAPKE, R.T.; RAMSING, N.B.; BATESON, M.M.; WARD, D.M. Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 650-659, 2003.

PARTENSKY, F.; HESS, W.R.; VAULOT, D. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. **Marine and Molecular Biology Review**, Cambridge, v. 63, n. 1, p. 106–127, 1999.

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

POLY, F.; RANJARD, L.; NAZARET, S.; GOURBIERE, F.; MONROZIER, L.J. Comparison of *nifH* gene pools between soils and between soils microenvironments of contrasting properties. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2255-2267, 2001.

POTTS, M. Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with communities of heterocystous and non-heterocystous blue-green algae in mangrove forest of Sinai. **Oecologia**, Berlin, v. 39, p. 359-373, 1979.

POTTS, M.; WHITTON, B.A. Vegetation of the intertidal zone of the lagoon of Aldabra, with particular reference to the photosynthetic prokaryotic communities. **Proceedings of the Royal Society of London, Serie B**, London, n. 208, p. 13-55, 1980.

RAI, A.N.; BERGMAN, B. Creation of new nitrogen-fixing cyanobacterial associations. **Biology and Environment: Proceedings Of The Royal Irish Academy**, Dublin, v. 102B, p. 65-68, 2002.

RAI, A.N.; BORTHAKUR M.; BERGMAN, B. Nitrogenase derepression, its regulation and metabolic changes associated with diazotrophy in the non-heterocystous cyanobacterium *Plectonema boryanum* PCC 73110. **Journal of General Microbiology**, London, v.138, p. 481-491, 1992.

RAMESHKUMAR, N.; NAIR, S. Isolation and molecular characterization of genetically diverse antagonistic, diazotrophic red-pigmented vibrios from diferent mangrove rhizospheres. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 67, p. 455-467, 2009.

RAMESHKUMAR, N.; FUKUI, Y.; SAWABE, T.; NAIR, S. *Vibrio porteresiae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a mangrove-associated wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 1608-1615, 2008.

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

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

RAPALA, J.; SIVONEN, K.; LYRA, C.; NIEMELA, S.I. Variation of microcystins cyanobacterial hepatotoxins in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 6, p. 2206-2212, 1997.

RAVEN, J.A. Evolution of cyanobacterial symbioses. In: Rai, A.N., Bergman, B., Rasmussen, U. (Ed.), **Cyanobacteria in Symbiosis**. Boston:Kluwer Academic Publishers, 2002, p. 329-346.

REJMÁNKOVÁ, E.; KOMÁRKOVÁ, E.J.; REJMÁNEK, M. ^{15}N as an indicator of N_2 -fixation by cyanobacterial mats in tropical marshes. **Biogeochemistry**, Washington, v. 67, p.353–368, 2004.

ROJAS, A.; HOLGUIN, G.; GLICK, B.R.; BASHAN, Y. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N_2 -fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 35, p. 181-187, 2001.

RÖSCH, C.; BOTHE, H. Improved Assessment of Denitrifying, N_2 -Fixing, and Total-Community Bacteria by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Using Multiple Restriction Enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 4, p. 2026–2035, 2005.

RÖSCH, C.; MERGEL, A.; BOTHE, H. Biodiversity of Denitrifying and Dinitrogen-Fixing Bacteria in an Acid Forest Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n.8, p. 3818–3829, 2002.

ROSENBAUM, V.; RIESNER, D. Temperature-gradient gel electrophoresis thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. **Biophysical Chemistry**, Chichester, v. 26, p. 235-246. 1987.

ROSENFELD, J.S. Functional redundancy in ecology and conservation. **Oikos**, Kobenhavn, v. 98, n.1, p. 156-162, 2002.

ROSSI, M.; MATTOS, I.F.A. Solos de mangue do Estado de São Paulo: Caracterização química e física. **Revista do Departamento de Geografia**, São Paulo, v. 15, p. 101–113, 2002.

RUINEN, J. Occurrence of Beijerinckia species in the ‘Phyllosphere’. **Nature**, London, n. 117, p. 220-221, 1956.

SÁ, A.L.B. **Diversidade de rizobacterias endoglícolíticas isoladas de mangue vermelho (Rhizophora mangle)**. 2008. 61p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Butantan/Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

SANDAU, E.; SANDAU, P.; PULZ, O. Heavy metal sorption by microalgae. **Acta Biotechnologica**, Berlin, v. 16, p. 227-235, 1996.

SANT’ANNA, C. L. Cyanophyceae marinhas bentônicas do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, SP, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 22, p. 197-216, 1995.

SANT’ANNA, C.L.; SIMONETTI, C. Cianofíceas marinhas bentônicas das praias de Peruíbe e dos Sonhos, município de Itanhaém, SP, Brasil, II: espécies epilíticas e epizóicas. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 52, p. 515-523, 1992.

SANT'ANNA, C.L.; BICUDO, R.M.T.; PEREIRA, H.A.S.L. Nostocophyceae (Cyano- phyceae) do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Estado de São Paulo, Brasil. **Rickia**, São Paulo, v.10, p. 1-27, 1983.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; BRANCO, L.H.Z.; BRAGA, M.R.A.; CORDEIRO-MARINO, M.; GUIMARÃES, S.M.P.B. Cianofíceas marinhas bentônicas das praias de Peruíbe e dos Sonhos, município de Itanhaém, SP, Brasil, III. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 389-407, 1995.

SANT'ANNA, C.L.; CORDEIRO-MARINO, M.; BRAGA, M.R.A.; GUIMARÃES, S.M.P.B. Cianofíceas marinhas bentônicas das praias de Peruíbe e dos Sonhos, município de Itanhaém, SP, Brasil, I. **Rickia**, São Paulo, n. 12, v. 89-112, 1985.

SANTOS, L.C.M.; CUNHA-LIGNON, M.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Impacto de petróleo no manguezal do rio Iriri (Baixada Santista, São Paulo): Diagnóstico da cobertura vegetal com base em fotografias aéreas digitais (1962-2003) In: Congresso de Ecologia do Brasil, 8, 2007, Caxambu – MG. **Anais...** Caxambu:SEB, 2007. p. 1-3.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRON-MOLERO, G.; ADAIME, R.R.; CAMARGO, T.M. Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian coast. **Estuaries**, Columbia, v. 13, n. 2, p. 204-218, 1990.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; MESQUITA, H.S.K.; CINTRON-MOLERO, G. The Cananéia lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil. **Estuaries**, Columbia, v. 13, n. 2, p. 193-203, 1990.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. **Applied and Environmental Microbiol.** Washington, v. 71, p.1501–1506, 2005.

SCHOENEBERGER, P.J.; WYSOCKI, D.A.; BENHAM, E.C.; BRODERSON, W.D. (Ed.), 2002. **Field book for describing and sampling soils, Version 2.0**. Natural Resources Conservation Service, National Soil Survey Center, Lincoln, NE.

SCHOPF, J.W. Cyanobacteria: pioneers of the early Earth. **Beihefte zur Nova Hedwigia**, Berlin, n. 112, p.13-32, 1996.

SCHOPF, J.W. Disparate rates, differing fates: Tempo and mode of evolution changed from the Precambrian to the Phanerozoic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, Washington, v. 91, p. 6735-6742, 1994.

SELLNER, K.G.; LACOUTURE, R.V.; PARRISH, C.R. Effects of increasing salinity on a cyanobacteria bloom in the Potomac River estuary. **Journal of Plankton Research**, New York, v.10, n. 1, p.49-61, 1988.

SHERIDAN, R.P. Epicaulous, nitrogen-fixing microepiphytes in a tropical mangal community, Guadeloupe, French West Indies. **Biotropica**, Washington, v. 23, p. 530-541, 1991.

SHERMAN, L.A.; MEUNIER, P.; COLÓN-LÓPEZ, M.S. Diurnal rhythms in metabolism: a day in the life of a unicellular, diazotrophic cyanobacterium. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 58, p. 25-42, 1998.

SHIMONY, C.; REINHOLD, L. Ultrastructure and ion gradients in the salt glands of *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. **The New Phytologist**, London, v. 72, p. 27-36, 1973.

SILVA, C.S.P. **Caracterização molecular de cianobactérias isoladas de ecossistema manguezal do Estado de São Paulo e identificação de produtos naturais**. 2010. 199p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2010.

SILVA, S.M.F. Flora de Cianofíceas marinhas bentônicas da Ilha da Inhaca, litoral sul de Moçambique, I. **Hoehnea**, São Paulo, n. 18, p. 107-125, 1991.

SOIL SURVEY STAFF, 2003. **Keys to Soil Taxonomy**, 9th ed. Office, Washington, DC. United States Department of Agriculture–Natural Resources Conservation Service. U.S. Gov. Print. 332 p.

SOIL SURVEY STAFF. **Soil Survey Field and Laboratory Methods Manual**. Soil Survey, Version 1.0. In: Burt, R. (Ed.). U.S. Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, 2009. 503 p. (Investigations Report No. 51).

SONG, T.; MARTENSSON, L.; ERIKSSON, T.; ZHENG, W.; RASMUSSEN, U. Biodiversity and seasonal variation of the cyanobacterial assemblage in a rice paddy field in Fujian, China. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 54, p. 131–140. 2005.

SOO, R.M. **Microbial Biodiversity of Thermophilic Communities in Hot Mineral Soils of Tramway Ridge, Mt. Erebus, Antarctica**. 2007. 159 p. Thesis (Masters of Science in Biological Science) University of Waikato, New Zealand. 2007.

SPILLER, H.; SHANMUGAM, K.T. Physiological conditions for nitrogen fixation in a unicellular marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Strain SF1. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, p. 5379–5384, 1987.

STAHL, D.A.; HULLAR, M.; DAVIDSON, S. The Structure and Function of Microbial Communities. **Prokaryotes**, New York, v. 1, p. 299–327, 2006.

STEFFAN, R.J.; ATLAS, R.M. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 45, p. 137-161, 1991.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. **Aplicação e Evolução dos Métodos Moleculares para o Estudo da Biodiversidade do Rizóbio**. Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, nov. 1999. 58p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 93).

SUZUKI, M.T.; BÉJÀ, O.; TAYLOR, T.; DeLONG, E.F. Phylogenetic analysis of ribosomal RNA operons from uncultivated coastal marine bacterioplankton. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 3., n. 5, p. 323-331, 2001.

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

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

TAN, Z.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of Rice. **Environmental Microbiology** Oxford, v. 5, n. 10, p. 1009–1015, 2003.

TATON, A.; GRUBISIC, S.; BRAMBILLA, E.; WIT, R.; WILMOTTE, A. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo dry valleys, Antarctica): a morfological and molecular approach. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5157-5169, 2003.

Ter BRAAK, C.J.F.; ŠMILAUER, P. **CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5)**. IthacaNY: Microcomputer Power, 2002. 500p.

Ter BRAAK, C.J.F.; ŠMILAUER, P. **CANOCO Reference manual and user's guide to canoco for windows. Software for canonical community ordination (version 4)**. New York: Microcomputer Power, 1998. 332 p.

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

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

TOLEDO, G.; BASHAN, Y.; SOELDNER, A. Cyanobacteria and black mangroves in Northwestern Mexico: colonization, and diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, n. 41, p. 999-1011, 1995a.

TOLEDO, G.; BASHAN, Y.; SOELDNER, A. In vitro colonization and increase in nitrogen-fixation of seedling roots of black mangrove inoculated by a filamentous cyanobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 1, p. 1012-1020, 1995b.

TOMLINSON, P.B. **The Botany of mangroves**. Cambridge:Cambridge University Press, U.K. 1986. 413 p.

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

TRIPP, H.J.; BENCH, S.R.; TURK, K.A.; FOSTER, R.A.; DESANY, B.A.; NIAZI, F.; AFFOURTIT, J.A.; ZEHR, J.P. Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium. **Nature**, London, v. 424, p. 90-94, 2010.

UKU, J.; BJÖRK, M.; BERGMAN, B.; DÍEZ, B. Characterization and Comparison of Prokaryotic Epiphytes Associated with Three East African Seagrasses. **Journal of Phycology**, Stuttgart, v. 43, p. 768-779, 2007.

USHER, K.M.; BERGMAN, B.; RAVEN, J.M. Exploring cyanobacterial mutualisms. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 38, p. 255-273, 2007.

VALIELA, I.; BOWEN, J.L.; YORK, J.K. Mangrove Forests: One of the World's Threatened Major Tropical Environments. **Bioscience**, Washington, v. 51, p. 807-815, 2001.

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

VERGIN, K.L.; RAPPE, M.S.; GIOVANNONI, S.J. Streamlined method to analyze 16S rRNA gene clone libraries. **Biotechniques**, Natick, n. 30, p.938-942, 2001.

WARD, D.M. A macrobiological perspective on microbial species. **Microbe**, Washington, v. 1, n. 6, p. 269-278, 2006.

WARD, D.M.; BATESON, M.M.; FERRIS, M.J.; KÜHL, M.; WIELAND, A.; KOEPEL, A.; COHAN, F.M. Cyanobacterial ecotypes in the microbial mat community of Mushroom Spring (Yellowstone National Park, Wyoming) as species-like units linking microbial community composition, structure and function. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 361, p. 1997-2008, 2006.

WATERBURY, J.B.; WATSON, S.W.; GUILLARD, R.R.; BRAND, L.E. Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. **Nature**, London, v. 277, p. 293-294, 1979.

WHITTON, B.A.; POTTS, M. Introduction to the cyanobacteria. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.1-11.

WIDMER, F.; SHAFFER, B.T.; PORTEOUS, L.A.; SEIDLER, R.J. Analysis of *nifH* Gene Pool Complexity in Soil and Litter at a Douglas Fir Forest Site in the Oregon Cascade Mountain Range. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 2, p. 374-380, 1999.

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

WOHL, D.L.; ARORA, S.; GLADSTONE, J.R. Functional redundancy supports biodiversity and ecosystem function in a closed and constant environment. **Ecology**, Durham, v. 85, p. 1534-1540, 2004.

WOOD, S.A.; MOUNTFORT, D.; SELWOOD, A.I.; HOLLAND, P.T.; PUDDICK, J.; CARY, S.C. Widespread Distribution and Identification of Eight Novel Microcystins in Antarctic Cyanobacterial Mats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 23, p. 7243–7251, 2008.

XU, D.; COTÈ, J.C. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' and 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 695-704, 2003.

YADAV, R.K.P.; KARAMANOLI, K.; VOKOU, D. Bacterial Colonization of the Phyllosphere of Mediterranean Perennial Species as Influenced by Leaf Structural and Chemical Features. **Microbial Ecology**, New York, v. 50, p. 185–196, 2005.

YAMAZAKI, S.; NOMATA, J.; FUJITA, Y. Differential Operation of Dual Protochlorophyllide Reductases for Chlorophyll Biosynthesis in Response to Environmental Oxygen Levels in the Cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 142, p. 911–922, 2006.

YANNARELL, A.C.; TRIPLETT, E.W. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 227–239, 2005.

YANNARELL, A.C.; STEPPE, T.F.; PAERL, H.W. Genetic variance in the composition of two functional groups (diazotrophs and cyanobacteria) from a hypersaline microbial mat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 1207–1217, 2006.

YANNARELL, A.C.; STEPPE, T.F.; PAERL, H.W. Disturbance and recovery of microbial community structure and function following Hurricane Frances. **Environmental Microbiology** Oxford, v. 9, n. 3, p. 576–583, 2007.

YANNARELL, A.C.; KENT, A.D.; LAUSTER, G.H.; KRATZ, T.K.; TRIPLETT, E.W. Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. **Microbial Ecology**, New York, v. 46, p. 391–405, 2003.

YU, Z.; MORRISON, M. Comparisons of Different Hypervariable Regions of *rrs* Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 8, p. 4800–4806. 2004.

ZEHR, J.P.; WARD, B.B. Nitrogen Cycling in the Ocean: New Perspectives on Processes and Paradigms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1015–1024, 2000.

ZEHR, J.P.; MELLON, M.T.; ZANI, S. New Nitrogen-Fixing Microorganisms Detected in Oligotrophic Oceans by Amplification of Nitrogenase (*nifH*) Genes **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 9, p. 3444–3450, 1998.

ZEHR, J.P.; MELLON, M.T.; BRAUN, S.; LITAKER, W.; STEPPE, T.; PAERL, H.W. Diversity of Heterotrophic Nitrogen Fixation Genes in a Marine Cyanobacterial Mat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 7, p. 2527–2532, 1995.

ZEHR, J.P.; WATERBURY, J.B.; TURNER, P.T.; MONTOYA, J.P.; OMOREGIE, E.; STEWARD, G.F.; HANSEN, A.; KARL, D.M. Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean. **Nature**, London, v. 412, n. 9, p. 635-638, 2001.

ZHANG, W.; KI, J.S.; QIAN, P.Y. Microbial diversity in polluted harbor sediments I: Bacterial community assessment based on four clone libraries of 16S rDNA. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 76, p. 668-681. 2008.

ZHANG, Y.; DONG, J.; YANG, Z.; ZHANG, S.; WANG, Y. Phylogenetic diversity of nitrogen-fixing bacteria in mangrove sediments assessed by PCR–denaturing gradient gel electrophoresis. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 190, p. 19–28, 2008.

ZHANG, Y.; DONG, J.; YANG, Z.; LING, J.; WANG, Y.; ZHANG, S. Bacterial community structure of mangrove sediments in relation to environmental variables accessed by 16S rRNA gene-denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. **Scientia Marina**, Barcelona, v. 73, n. 3, p. 487-498, 2009.

ZUBERER, D.A.; SILVER, W.S. Biological dinitrogen fixation (acetylene reduction) associated with Florida mangroves. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n. 35, p. 567-575, 1978.