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

Diversidade e estrutura de comunidades de *Bacteria e Archaea* em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo

Gisele Lopes Nunes

Dissertação apresentada, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2006**

Gisele Lopes Nunes
Bióloga

**Diversidade e estrutura de comunidades de *Bacteria e Archaea* em solo de mangue
contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**

Orientador:
Prof. Dr. **MARCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Dissertação apresentada, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

**Piracicaba
2006**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Nunes, Gisele Lopes

Diversidade e estrutura de comunidades de *Bacteria* e *Archaea* em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos do petróleo / Gisele Lopes Nunes. - - Piracicaba, 2006.
84 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Bactérias 2. DNA 3. Ecologia microbiana 4. Ecossistemas de mangue 5. Microbiologia do solo 6. Petróleo 7. Poluição do solo I. Título

CDD 631.46

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

DEDICATÓRIA

A **DEUS** por tudo que me concede;

Ao meu irmão, **MÁRCIO** (*in memoriam*), cuja ausência
é a maior presença em minha vida;

Aos meus pais, **JOÃO E ZIZA**, símbolo de garra, honestidade, humildade, bondade,
competência; por nunca terem se deixado faltar em minha vida, mesmo com a distância. Sem
você eu não teria chegado aqui;

Ao meu irmão **CLÁUDIO** por ser meu companheiro, melhor amigo e por me apoiar em todas
as minhas decisões. Você é o meu maior orgulho.

E que junto a **LUCIANA**, conceberam minha maior paixão, o **GUSTAVO** que faz com que a
distância, a saudade e a vontade de presenciar suas primeiras descobertas seja ainda maior.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pela vida, por me fortificar diante de todos os obstáculos e por conceder o que há de mais valioso para mim...minha FAMÍLIA.

À toda minha Família, que sempre me apoiou apesar da distância que nos separa.

À avó Maria que sempre me apoiou em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais pelo incentivo, confiança, orientação facilitando a execução deste trabalho e sobre tudo a amizade e convívio pessoal.

À CAPES, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À Coordenação do PPG Microbiologia Agrícola e à Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ-USP por me conceder a oportunidade de realizar este projeto.

Ao Prof. Dr. Pablo Vidal-Torrado pelo apoio e cooperação oferecidos.

Aos colegas do I.O.-USP, Prof. Dra. Márcia Bicego e Maurício Coimbra pela amizade e ajuda no trabalho de campo.

À Profa. Dra. Helaine Carrer, pela permissão do uso das instalações do CEBTEC para o seqüenciamento das amostras. E, especialmente a Fátima pelo apoio e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Solos pelas contribuições: Luiz Silva, Denise, Fernando, Flávia, Martinha, Jack, Dorival e Karina. Em especial aos técnicos Luis Fernando Baldesin, Denise L. C. Mescolotti e Luis Silva pela paciência e ajudas durante os experimentos.

À Família KIFUÁ: Sabrina, Rogéria, Marina, Fernanda, Patrícia, Fábila (*in memoriam*), Paula, Thais, Edilaine, Tarsila, Tânia e agregadas Sâmira, Érikinha, Karina, Daniela pelos melhores anos de minha vida piracicabana, pelo apoio, incentivo, amizade e companheirismo durante estes anos que vivemos juntas.

Aos amigos de laboratório, pelos momentos de trabalho e companheirismo: Adriano Lucheta, Carolina Maluche, Daniele Takahashi, Denise Santos, Eduardo Dutra, Gisele “uai”, Hélio, Juliano Cury, Karina Cenciani, Lucas Azevedo, Márcio Moraes “Ovo”, Pablo Hardoim, Rafael Dutra, Robinson Moresca, Simão Lindoso, Soraya Kiriachek, Wladimir e todos estagiários. Em especial à Daniele Takahashi pela paciência, e humildade em transmitir todo seu conhecimento nas horas que mais precisei e ao Juliano Cury pela ajuda nas análises de bioinformática.

Aos meus amigos do Curso de Pós-Graduação: Camila Jordão, Daniele Benedito, Simone Braga, Luana Botelho, Alessandra, Pilar, Lillian Zaros e Daniele Toledo pelos bons momentos compartilhados.

Aos meus amigos Esalqueanos: Arroto, Bizerra, Lotação, Relpi, Malhada, Di-lúvio, C-nta, Bala e as repúblicas amigas: Reboq, Jakrepaguá, Uspeão e Zona Rural pelas noites mal dormidas e as modas de viola “MERCEDITA...”

Aos meus amigos de graduação: Flavinha, Juliano Benotti, Alexandre Freire, Ivo “Papito”, Luciana Santos, Lillian Pedroso, Digão, Rachel Balan, Sabrina e Karina (Éternamente), onde tudo começou.

Às grandes amizades piracicabanas: Karina, Flavia Cones, Fernanda Polacow, Luciana e Marcelo, Nádia e Marquinho pelos momentos de alegria e descontração.

À minhas “irmãs-amigas” Gija e Patrícia Tamura que sempre me acompanharam do Brasil ao Japão, minha eterna admiração e gratidão. Muito obrigada pelo apoio, vocês sempre estarão comigo.

Aos meus pequeninos Gustavo, João Pedro, Johan, Ana Alice e Pedro Tamura que chegaram para alegrar nossas vidas.

À amiga Camila “Pamy” que tanto me ajudou nesta reta final. Obrigada amiga !!!

À grande amiga Thais Emídio, que sempre me deu força para lutar por meus objetivos e que nunca me deixou desistir nas horas de maior aflição. Obrigada pela imensa ajuda nas correções desta dissertação.

“Nada agrada tanto à alma como uma amizade fiel e doce.

Que felicidade a de encontrar corações aos quais se possa sem temor confiar quaisquer segredos; consciências, que nos temem menos do que a nossa; companheiros cuja palavra acalma nossas inquietações, cujos conselhos guiam nossas decisões, cuja alegria dissipa nossa tristeza e cuja visita seja para nós um prazer!”

Sêneca

À todos que estiveram envolvidos indiretamente neste trabalho, para que houvesse êxito.

OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 DESENVOLVIMENTO	12
2.1 Revisão de literatura	12
2.1.1 Características dos manguezais	12
2.1.2 Distribuição geográfica	13
2.1.3 Solo de mangue	15
2.1.4 Diversidade microbiana dos solos	16
2.1.5 Petróleo no ambiente	20
2.2 Material e métodos	23
2.2.1 Área de estudo	23
2.2.2 Amostragens	23
2.2.3 Análises laboratoriais	25
2.2.4 Carbono na biomassa microbiana	25
2.2.5 Análise químicas	25
2.2.5.1 Matéria Orgânica (MO)	25
2.2.5.2 Nitrogênio e Enxofre	26
2.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE)	26
2.2.6.1 Extração do DNA total do solo	26
2.2.6.2 PCR	27
2.2.6.3 DGGE	28
2.2.6.4 Análise Estatística de UTOs	28
2.2.7 Bibliotecas de rDNA 16S	28
2.2.7.1 Amostras	28
2.2.7.2 Extração de DNA metagenômico do solo	29
2.2.7.3 Amplificação do rDNA 16S	29
2.2.7.4 Clonagem dos amplicons	29
2.2.7.5 Extração de plasmídeos	30

2.2.7.6 Sequenciamento utilizando “Big Dye Terminator”	30
2.2.7.7 Análise das seqüências do rDna 16S	31
2.3 Resultados.....	32
2.3.1 Carbono da biomassa microbiana (CB).....	32
2.3.2 Matéria orgânica (M.O).....	35
2.3.3 Teor de carbono (C-total)	36
2.3.4 Teor de nitrogênio (N-total)	36
2.3.5 Teor de enxofre total (S-total)	36
2.3.6 pH.....	36
2.3.7 Estrutura das comunidades de <i>Bacteria</i>	37
2.3.8 Estrutura das comunidades de <i>Archea</i>	38
2.3.9 Sequenciamento do rDNA 16S de <i>Bacteria</i>	42
2.4 Discussão dos resultados	54
2.4.1 Atributos químicos do solo.....	54
2.4.2 Diversidade de UTOs de <i>Bacteria</i> e <i>Archea</i>	55
3 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS.....	66
ANEXO.....	81

RESUMO

Diversidade e estrutura de comunidades de *Bacteria* e *Archaea* em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo

Os impactos da poluição por hidrocarboneto de petróleo sobre a diversidade e funcionalidade das comunidades microbianas em manguezais não são totalmente conhecidos, principalmente devido às limitações metodológicas para acessar os microrganismos não-cultiváveis. No entanto, vários métodos moleculares independentes de cultivo têm sido utilizados para investigar a diversidade e a estrutura das comunidades microbianas em ecossistemas naturais. O objetivo deste trabalho foi avaliar as variações da estrutura das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* e a diversidade de *Bacteria* em uma transeção de solo de mangue do rio Iriri (Bertioga, SP) com um gradiente de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. As análises por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) mostraram que as comunidades de *Bacteria* e *Archaea* nas diferentes posições geográficas foram mais similares entre si do que entre diferentes profundidades ao longo do perfil em uma mesma posição geográfica. A análise das seqüências de clones de rDNA 16S de *Bacteria* dos diferentes pontos amostrados em abril de 2000, mostrou que a diversidade genética, avaliada pelo índice de Shannon, das comunidades microbianas diferem estatisticamente somente entre ponto o P1 (ponto menos contaminado) e P3 (ponto mais contaminado). As estimativas não-paramétricas da riqueza de espécies mostraram que P1, P2 e P3 possuem mais de 3539, 2524 e 1421 espécies bacterianas, respectivamente. Já, para as amostras do ponto P2 coletadas nos anos 2000 e 2004, muito embora os valores dos índices de Shannon tenham sido semelhantes, houve uma provável dominância de grupos específicos nas amostras coletadas em 2004, verificada pelos altos valores da recíproca do índice de Simpson. Os dados mostraram também que o número estimado de espécies bacterianas no ponto P2 diminuiu com o tempo, sendo menor em amostras de 2004, se comparado com amostras de 2000. No geral, a afiliação filogenética dos clones de rDNA 16S mostrou a grande diversidade de espécies, a maioria não conhecidas. Os dados sugerem que a contaminação do solo de mangue do rio Iriri está selecionando microrganismos mais adaptados às fontes de carbono introduzidas no solo.

Palavras-chave: Mangue; Solo; Diversidade microbiana; Microrganismos; *Bacteria*; *Archaea*; rDNA 16S; DGGE

ABSTRACT

Diversity and community structure of Bacteria and Archaea in mangrove soil contaminated with petroleum hydrocarbon

The impacts of petroleum hydrocarbon pollution on the diversity and functionality of the microbial communities in mangrove soils are not totally understood, mainly due to the methodological limitations to access unculturable microorganisms. However, several culture-independent molecular methods have been used to investigate the diversity and structure of microbial communities in natural ecosystems. The aim of this work was to evaluate shifts in *Bacteria* and *Archaea* community structures and the diversity of *Bacteria* in a soil transection of the Iri river mangrove (Bertioga, SP) showing a petroleum hydrocarbon contamination gradient. The analyses by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) showed that the communities of *Bacteria* and *Archaea* in different geographical positions were more similar among them than the communities in different depths along the soil profile at the same geographical position. Sequence analyses of bacterial 16S rDNA clones from different points sampled in April 2000 showed that the genetic diversity of the bacterial communities, based on the Shannon index, differ statistically only between P1 (less polluted) and P3 (more polluted) locations. Non-parametric estimates of species richness showed that P1, P2 and P3 may have more than 3539, 2524 and 1421 bacterial species, respectively. For P2 sampled in years 2000 and 2004, even though the Shannon indices were similar, there was a probable dominance of specific bacterial groups in year 2004, based on the high values of the reciprocal of Simpson's index. The data also showed that the estimated number of bacterial species in P2 decreased with the time, being lower in samples collected in 2004, as compared to samples collected in 2000. In the general, the phylogenetic affiliation of the 16S rDNA clones showed high bacterial species diversity, and most of the bacteria were of unknown species. The data suggest that the contamination of Iri river mangrove soil with petroleum hydrocarbon is selecting microorganisms more adapted to the introduced carbon sources into the soil.

Keywords: Mangrove; Soil; Microbial diversity; *Bacteria*; *Archaea*; rDNA 16S, DGGE; Petroleum

1 INTRODUÇÃO

Os manguezais são considerados ambientes dinâmicos, localizados em regiões costeiras sujeitas a inundações periódicas, por estar em associação às desembocaduras dos rios. Oferecem condições próprias para alimentação, proteção e reprodução de muitas espécies de animais, sendo um ambiente importante para manutenção do equilíbrio da vida marinha (SCHAEFFER-NOVELLI, 1999). Mais de um terço da costa brasileira é coberta por manguezais, os quais ocupam uma faixa estreita nas zonas entre marés.

A ocupação e exploração desordenada, bem como a contaminação dos manguezais por esgotos e derramamento de petróleo tem causado sérios danos a esse ambiente extremamente vulnerável. O petróleo e seus derivados podem persistir por mais de 20 anos nos manguezais devido à lenta biodegradação dos seus componentes, à baixa limitação de oxigênio no meio e a lenta ciclagem de nutrientes essenciais para atividade aeróbia (SCHERRER & MILLER, 1989). Microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo são encontrados em abundância nos oceanos e podem ser encontrados em solo de mangues também. Várias espécies de procariotos têm demonstrado grande potencial para degradação de hidrocarbonetos de petróleo, sendo as populações de bactérias degradadoras desses poluentes maiores em sedimentos contaminados do que os não contaminados.

Microrganismos encontrados em manguezais possuem papel fundamental nas transformações bioquímicas de nutrientes e são essenciais para degradação da matéria orgânica e poluentes. Assim, impactos antrópicos que afetam a diversidade e/ou a funcionalidade da microbiota dos solos de mangue podem influenciá-la na dinâmica dessas transformações e comprometer a qualidade dos solos (URUKAWA, 2000).

A avaliação dos impactos antrópicos sobre as comunidades microbianas apresenta uma série de limitações, já que mais de 90-95% dos microrganismos do solo não podem ser cultivados empregando-se os métodos convencionais de cultivo.

Um grande avanço nos estudos de ecologia microbiana foi dado com o uso de técnicas moleculares baseando-se na análise do gene que codifica o RNA ribossômico (rDNA) extraído diretamente de ambientes naturais. Diversidade e a estrutura das comunidades microbianas podem ser avaliadas pela variabilidade das seqüências de rDNA 16S através de eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) e seqüenciamento (MUYZER; SMALLA, 1998; ARMANN; LUDWIG, 2000; ØVREÅS, 2000).

Os impactos antrópicos sobre os manguezais têm sido objetos de estudo de mais diversas áreas do conhecimento científico. Entretanto, ainda são escassos os trabalhos sobre caracterização das comunidades microbianas de manguezais brasileiros, e como ela responde às inúmeras alterações causadas pelas atividades antrópicas.

Os objetivos deste trabalho são comparar as alterações na estrutura das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* em uma transeção de solo de mangue contaminado com petróleo, e avaliar as alterações na diversidade bacteriana em função da localização em relação ao ponto do derramamento de petróleo e do tempo, através de PCR-DGGE e seqüenciamento de clones de rDNA 16S.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão de literatura

2.1.1 Características dos manguezais

Os manguezais são formados em regiões de planícies costeiras ou vales alagados limitados por baixios em estuário delta. O ecossistema de mangue forma um elo entre os ambientes marinho, terrestre e de água doce, caracterizado por uma constante conquista de novas áreas devido ao acúmulo de grandes massas de sedimentos e detritos trazidos pelos rios e mar. Este ambiente é considerado de transição e de alta produtividade, apresentando altos níveis de carbono orgânico, geralmente em condições anóxicas (ROSSI; MATOS, 1992; VANUCCI, 1999).

Os manguezais são sistemas jovens que, seguindo a dinâmica das marés das áreas onde se localizam, produzem mudanças na topografia local resultando numa seqüência de recuos e avanços da cobertura vegetal. São sistemas funcionalmente complexos, altamente resilientes (FIRME, 2003). A cobertura vegetal se instala em substratos de vasa de formação recente, de pequena declividade, sob ação diária das marés de água salgada ou salobra (SCHAEFFER-NOVELLI, 1999). A salinidade das águas dos manguezais pode variar de 0,5‰ a 30‰ (ODUM, 1982; NAIDOO; TUFFERS; von WILLERT, 2002), sendo que na superfície do solo a salinidade em geral diminui com o aumento da distância dos rios e canais em relação ao mar, exceto nos locais desprovidos de vegetação, onde a evaporação é mais intensa. Os teores de oxigênio dissolvido nas águas dos canais responsáveis pela inundação dos manguezais geralmente diminui gradualmente, desde a área próxima à baía até a parte superior do manguezal (SCHAEFFER-NOVELLI, 1999).

A importância ecológica dos manguezais deriva de um grande número de funções desempenhadas por este ecossistema, tais como: amenização do impacto do mar na terra; controle de erosão pelas raízes presentes nos manguezais; retenção de sedimentos terrestres do escoamento superficial pelas raízes; filtro biológico de sedimentos, nutrientes e mesmo poluentes; e abrigo de animais marinhos em período de reprodução.

Segundo Sant'Anna e Whately (1981), os manguezais apresentam grande produtividade biológica e alto teor de matéria orgânica, e são considerados muito importantes do ponto de vista ecológico, por sua contribuição na cadeia alimentar costeira.

No que se refere à importância econômica, os manguezais são fontes de diversos recursos e sua exploração direta pode ser feita de três formas: extrativismo, agricultura e silvicultura. Diversos produtos são extraídos deste ecossistema, principalmente a madeira, utilizada como combustível doméstico e comercial, e na construção de barcos, casas, mourões e instrumentos de pesca. Além da madeira, as cascas, as folhas, as flores e os frutos são utilizados para diversos fins, sendo o mais importante a obtenção de tanino para o curtimento de couro, e tingimento e proteção de redes de pesca (LAMPARELLI, 1998). Os manguezais possuem condições que os tornam capazes de abastecer uma população humana local gerando alimento não só para subsistência (EL-TARABILY, 2002; FIRME, 2003) como também propiciando pequeno comércio acessório de uma considerável quantidade de moluscos, crustáceos e principalmente peixes (FIRME, 2003). Dentre as diferentes formas de uso dos manguezais, a mais recomendada é a captura controlada de animais, para não haver super-exploração e degradação do ecossistema.

2.1.2 Distribuição geográfica

Segundo Lacerda. (1984), estima-se a existência de 20 milhões de hectares de manguezais em todo mundo, sendo que, as maiores florestas encontram-se na Malásia, Índia, Brasil, Venezuela, Nigéria e Senegal. Na América Latina, os manguezais cobrem aproximadamente 4 milhões de hectares nas costas Atlântica e Pacífica (LACERDA et al. 1993).

Os manguezais do Brasil podem ser encontrados desde o extremo norte, no Amapá (Cabo de Orange), até o Sul de Santa Catarina, na foz do rio Araguaia (VANNUCCI, 1999; LACERDA, 1984, SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2001) ocupando uma área de aproximadamente 25.000 km² (LACERDA, 1984). A região da Baixada Santista, formada pelos municípios de Bertioga, Cubatão, Guarujá, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos e São Vicente, possui uma área total de cobertura vegetal de 1.716,6 Km², sendo que 6% é representado por vegetação de mangue. A Baixada Santista e o Litoral Sul Brasileiro apresentam feições bastante distintas do Litoral Norte Brasileiro, com condições propícias à formação de manguezais. Essas condições decorrem do grande número de rios nessas planícies sob influência de maré, além da alta pluviosidade, a qual favorecem o aporte de sedimentos e nutrientes, além de manter a salinidade em níveis adequados à diferentes espécies vegetais (LAMPARELLI, 1998).

Figura 1.1-Distribuição geográfica dos manguezais na Baixada Santista (Fonte: Instituto Geográfico e Cartográfico- ICG e Emplasa/ DIF/CIE - Coordenadoria de Informações Estatísticas. Elaboração: Emplasa, 2002). (http://www.emplasa.sp.gov.br/estatistica_teste/baixada/mapas/mapa_I1.jpg)

Um levantamento sobre a abrangência dos manguezais do Estado de São Paulo foi constatado que o manguezal de Bertioga representa 8% da área total dos manguezais do Estado e 15% da Baixada Santista, sendo que esta ocupa 52% da área total de manguezais do Estado (Figura 1.2) (LAMPARELI, 1998). A região Sul e a região Norte ocupam 47% e 1% da área total de manguezais do Estado de São Paulo, respectivamente.

Figura 1.2-Área ocupada por manguezais nos municípios da Baixada Santista (Fonte: Mapeamento dos ecossistemas costeiros do Estado de São Paulo - Cetesb, 1999)

O manguezal, como ecossistema tipicamente tropical, ocorre preferencialmente associado a determinadas características climáticas, como: temperaturas médias acima de 20 °C; médias de temperaturas mínimas superior ou igual a 15 °C; amplitude térmica anual menor que 5 °C e precipitação pluvial acima de 1550 mm/ano, sem períodos de seca prolongados (SCHAEFFER-NOVELLI, 2001).

Apesar de o Brasil ser o país com maior extensão de manguezais, há sérias preocupações, tanto no que diz respeito à conservação quanto à recuperação desses ecossistemas, os quais vêm sendo destruídos devido a expansão urbana, obras de engenharia, lixões, marinas, cultivo de camarão e aterros sanitários (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2001).

2.1.3 Solos de mangue

Os sedimentos depositados nos manguezais são redistribuídos tão logo se depositem, sofrendo alterações químicas e físicas típicas do ecossistema de mangue (VANNUCCI, 1999). Segundo Cintrón e Schaeffer (1983), nos solos desses ecossistemas, por serem ambientes de baixa energia, predominam as frações mais finas (argila e silte), elevadas quantidades de matéria orgânica e sais solúveis, em função do contato com o mar. Devido à composição da serapilheira e à saturação pela água, estes solos possuem baixo potencial redox, cores acinzentadas a preta, com presença de H₂S. Solos de mangue podem ter vários metros de profundidade sendo fracamente consolidado e semi-fluídos (FERREIRA, 2002).

Os solos de mangue são formados pela deposição de partículas de origem terrestre e marinha, orgânicas e inorgânicas que estão em suspensão na água, e se movimentam por meio do fluxo e refluxo das marés. A deposição das frações do solo é uma ação mecânica onde as partículas grossas se depositam primeiro, seguidas das partículas de silte e argila, as quais se agregam e sedimentam por floculação (VANNUCCI, 1999; STRALHER; STRALHER, 2000). Em canais de marés, onde ocorre inundações diurnas e deposição de sedimentos, há predominância da fração silte, já as frações mais finas de argila são regularmente removidas e levadas do manguezal por marés vazantes (GAMERO, 2001).

Em função do alagamento, a taxa de difusão do oxigênio no solo é reduzida, não suprimindo a demanda microbiana para oxidação da matéria orgânica. A decomposição da matéria orgânica passa então a ocorrer através de microrganismos anaeróbios receptores de elétrons alternativos ao

O₂, seguindo a seguinte seqüência termodinâmica: NO₃⁻, Mn⁴⁺, Fe³⁺, SO₄²⁻, CO₂ (metanogênese), N₂ e H⁺ (SCHULZ, 2000).

A combinação de elevados conteúdos de matéria orgânica e enxofre em condições de anaerobiose, as fontes de Fe reativo (via aportes de sedimentos inorgânicos) e as fontes de SO₄²⁻ prontamente disponíveis fazem dos solos de mangue um ambiente propício à ocorrência de redução bacteriana do sulfato a sulfeto, e a conseqüente precipitação de Fe na forma de pirita (FeS₂) (BREEMEN; BUURMAN, 1998).

Breemen e Buurman (1998) consideram o fluxo de marés importantíssimo para formação da pirita, por aumentar o suprimento de oxigênio necessário para a completa piritização dos óxidos de Fe (III), e ainda facilitam a remoção do bicarbonato formado durante a redução do sulfato, ocasionando a diminuição do pH, o que acelera a formação da pirita.

No geral, os solos de mangue apresentam variada composição mineralógica, principalmente na fração argila, a qual é composta de um ou mais filossilicatos e óxidos de ferro (DILLA et al., 2005).

Todas as classes de solos que ocorrem em áreas de manguezais estão associadas a influências marcantes da água. Nessas áreas vários solos podem ocorrer: Areias Quartzosas Marinhas, Podzóis hidromórficos (em terraços arenosos), solos hidromórficos, solos Gley, solos orgânicos com tiomorfismo, e solos Aluviais, principalmente da era Cenozóica (LANI, 1998).

Além dos constituintes minerais do solo, existem muitos organismos que nele habitam, e que podem contribuir para formação e funcionamento. A fauna do solo de mangue é relativamente bem conhecida. No entanto, pouco se sabe sobre a microbiota desses solos, dificultando a compreensão da dinâmica do ecossistema, especialmente o fluxo de energia, a mineralização da matéria orgânica e as transformações do Fe e S.

2.1.4 Diversidade microbiana dos solos

Segundo Tótola e Chaer (2002), diversidade biológica é a variedade de espécies em um ecossistema, assim como a variedade de genótipos dentro da mesma espécie. A diversidade biológica dos solos pode ser explicada pela riqueza de espécies e suas ligações com os processos bioquímicos no solo (KENNEDY; SMITH, 1995).

A real dimensão da diversidade microbiana dos solos é ainda desconhecida. Tem sido estimado que o número global de células procarióticas no solo é de $4.5-6.6 \times 10^{30}$ e que aproximadamente 2-3% dos procariotos ocorrem nas águas dos oceanos, 4.5-6.5% nos solos, e a vasta maioria na superfície (WHITMAN et al., 1998). Estudos relacionados à diversidade microbiana do solo auxiliam na identificação de alterações que ocorrem no ambiente (ØVREÅS, 2000; KENNEDY; SMITH, 1995; MUYZER, 1993).

Os processos bioquímicos prevalentes nos solos são definidos em função da organização das comunidades microbianas, as quais são chave para o funcionamento do sistema solo-planta. No entanto, as relações entre estruturas das comunidades microbianas e as atividades bioquímicas que ocorrem nos solos são muito pouco conhecidas, dificultando o entendimento dos mecanismos que regulam o funcionamento dessas comunidades (LAMBAIS et al., 2005).

Segundo Lambais et al. (2005), a diversidade microbiana pode ter um papel importante na manutenção da qualidade dos solos. Organizando-se de forma previsível em diferentes condições edáficas ou em resposta a diferentes tipos de distúrbios, as comunidades microbianas poderiam ser utilizadas como indicadores de qualidade dos solos.

Estudos sobre o impacto de alterações ambientais em comunidades microbianas e suas atividades têm sido amplamente reportados, mas muitas vezes são restritos a avaliações de parâmetros genéricos como contagem de microrganismos, biomassa microbiana, taxa respiratória total e atividades enzimáticas envolvidas na mineralização do C e N. Esses parâmetros são muitas vezes sensíveis o suficiente para detectar determinados impactos ambientais (ØVREÅS ET AL., 1997; NOGUEZ et al., 2005; THERON, 2000, LAMBAIS et al., 2005; TÓTOLA; CHAER, 2002).

Um grande avanço nos estudos da ecologia microbiana foi dado com a aplicação de técnicas moleculares, baseadas na análise do DNA total extraídos diretamente de ambientes naturais sem a necessidade de cultivar microrganismos (MUYZER; SMALLA, 1998; ARMANN; LUDWIG, 2000; PACE et al., 1986; ØVREÅS, 2000; ØVREÅS, 1997; MUYZER et al., 1993; ZHOU et al., 2004, KEMP; ALLER, 2004). Os estudos moleculares tornaram-se possíveis a partir de Pace et al. (1986), pioneiros em análises de comunidades microbianas utilizando informações de seqüências de nucleotídeos do gene que codifica o RNA ribossômico 16S (rDNA), um gene muito conservado encontrado em todas as células procarióticas.

Uma das técnicas utilizadas para avaliar as estruturas das comunidades microbianas, através da variabilidade das seqüências de rDNA 16S, é a eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE), método desenvolvido por Muyzer, Wall e Uitterlinden em 1993 (MUYZER; WALL; UITTERLINDEN, 1993). O DGGE consiste na separação de fragmentos de DNA de mesmo tamanho, obtidos por amplificação de uma região específica de um gene pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente desnaturante de uréia e formamida (MUYZER; WALL; UITTERLINDEN, 1993). O padrão de migração desses fragmentos (amplicons) no gel é resultado da composição de nucleotídeos dos mesmos e seu teor G+C (LAMBAIS et al., 2005). A técnica de DGGE não é suficiente para determinar e identificar diretamente as espécies ou grupos taxonômicos em uma amostra (JOYNT et al., 2006), para tanto é necessário fazer a excisão do amplicon do gel e seqüenciá-lo (LAMBAIS et al., 2005).

O seqüenciamento do rDNA 16S a partir de amostras ambientais tem contribuído para o conhecimento da diversidade e da estrutura das comunidades de procariotos nos mais diferentes ambientes (SINGLETON, 2001; LAMBAIS et al., 2005; KEMP; ALLER, 2004), revelando que a diversidade microbiana é muito maior do que se imaginava (LOZUPONE; KNIGHT, 2005; PACE, 1986; ZHOU et al., 2004; KEMP; ALLER, 2004).

A análise de comunidades microbianas, é através do seqüenciamento de clones de rDNA 16S que se baseia na amplificação de um fragmento específico do rDNA 16S, a partir do DNA metagenômico, utilizando-se iniciadores específicos, clonagem desses amplicons em vetores apropriados e seqüenciamento dos insertos (ARMANN; LUDWIG, 1995; MCCAIG; GLOVER; PROSSER, 1999). Uma das limitações da utilização de PCR para obtenção de clones representativos de uma comunidade é a amplificação preferencial de algumas subpopulações mais abundantes, em detrimento das menos abundantes (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998). Esta técnica possibilita a estimativa da diversidade microbiana de um ambiente têm permitido a identificação de parâmetros ambientais (poluição, manejo agrícola, etc.) que afetam essa diversidade (MCCAIG; GLOVER; PROSSER, 1999).

As introduções geradas a partir do seqüenciamento de rDNA 16S representam uma grande quantidade de dados que precisam ser processadas com auxílio de algoritmos específicos (LAMBAIS et al., 2005) que podem ser utilizados para diferentes tipos de análises. A avaliação da diversidade e a comparação de comunidades de procariotos são baseadas no grau de

similaridade entre seqüências de rDNA 16S, as quais serão agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTO) ou filotipos (NÜBEL et al., 1999; STACH et al., 2003). Normalmente seqüências de rDNA 16S com similaridade maiores do que 97% são consideradas como sendo da mesma espécie, muito embora esse nível de similaridade não seja consenso na literatura (LOZUPONE; KNIGHT, 2005; KEMP; ALLER, 2004; NÜBEL et al., 1999; STACH et al., 2003). A estimativa da diversidade baseada em OTUs deve ser cautelosamente interpretada, já que os níveis de similaridade entre as seqüências de rDNA 16S para definição de OTUs não são consensuais. No entanto, o uso de UTOs é apropriado para comparar riqueza relativa quando se avalia seqüências de rDNA 16S de uma mesma região ou de mesmo tamanho (STACH et al. 2003).

Informações geradas a partir do seqüenciamento de genes de rDNA 16S, podem ser comparadas com seqüências depositadas em bancos de dados públicos (GeneBank do NCBI), para determinação do organismo com seqüência mais similar e suas possíveis funções no solo (LAMBAIS et al., 2005; CURY, 2006), e o Ribossomal Database Project II, o qual permite a determinação das relações filogenéticas das seqüências de rDNA 16S obtidas com seqüências depositadas. Por meio dessas seqüências, também é possível comparar comunidades microbianas de ambientes diferentes. Para isso foi criado o programa S-LibShuff (<http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/S-LibShuff.html>), o qual foi utilizado para determinar as dissimilaridades entre duas ou mais bibliotecas de rDNA 16S (SCHLOSS; LARGET; HANDELSMAN, 2004).

Métodos paramétricos e não-paramétricos vêm sendo muito utilizados para estimar a riqueza de espécies microbianas em amostras ambientais (BOHANNAN; HUGHES, 2003; GASTON, 1996; CHAO ET AL., 2006; SHEN; CHAO; LIN, 2003). Modelos paramétricos são muito eficientes para avaliar a abundância relativa de UTOs em amostras relativamente grandes. Portanto, este método é recomendado para estimar diversidade de microrganismos que são dominantes necessitando de grandes quantidade de dados para suportar os modelos de abundância. Em contraste, métodos não-paramétricos foram desenvolvidos para estimar diversidade a partir de pequenas amostras da comunidade considerando as espécies raras, presentes uma ou duas vezes por amostra e não depende do conhecimento prévio do tipo de distribuição de freqüência de ocorrência dos microrganismos (KEMP; ALLER, 2004; CHAO, 2005).

Os estimadores não-paramétricos mais utilizados para avaliar a diversidade de espécies microbianas são o Chao1 e ACE (Abundance-Based Coverage Estimator). O primeiro utiliza o número de espécies raras para estimar a riqueza de UTOs (BOHANNAN; HUGHES, 2003, CHAO, 2005), considerando os filotipos que aparecem uma ou duas vezes dentro de uma biblioteca determinada. O segundo separa as espécies em grupos raros e abundantes e somente os grupos raros são utilizados para estimar a diversidade não-conhecida (CHAO; LEE, 1992), estimando o número total de filotipos em um ambiente. Este estimador é recomendado para amostras que contenhas uma maior abundância de indivíduos da mesma espécie (KEMP; ALLER, 2004). A riqueza de espécies é um dos componentes dos índices de diversidade que é utilizado para compreensão do funcionamento de uma comunidade complexa. Os índices de diversidade consistem nas relações entre o número de espécies que compõem a comunidade e o número de indivíduos de cada população (MARGALEF, 1958).

2.1.5 Petróleo no ambiente

Na década de 60, grandes derramamentos de petróleo no mundo como o naufrágio do tanque Torrey Canyon no English Channel e o incidente de Santa Bárbara chamaram a atenção para a problemática do petróleo como poluente ambiental. Depois desses incidentes, vários estudos para verificar o destino e as consequências do derramamento do petróleo nos ecossistemas foram iniciados (ATLAS, 1981).

Os grandes derramamentos de petróleo são gerados devido à exploração e atividades de produção como: acidentes com tanques marinhos, perfuração de leitos marinhos complexos, frotas marítimas, refinarias costeiras e urbanas, e vazamentos associados (EL-TARABILY, 2002; MILLE et al., 2006). Os derramamentos mais catastróficos ocorrem geralmente em locais costeiros, afetando o ecossistema marinho e litorâneo, principalmente os manguezais (MELO; AZEVEDO, 1998; MILLE et al., 2006).

Uma importante quantidade de hidrocarbonetos (3×10^6 t) é introduzida a cada ano em ambientes marinhos (MILLE et al., 2006). Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) são uma das maiores causas de poluição ambiental e podem ser encontrados em qualquer ambiente natural sendo que as suas principais fontes são: biogênica, geoquímica (BAMFORTH, 2005; MILLE et al., 2006), diagênicas, pirolíticas (MILLE et al., 2006) e antropogênica. PAH ocorrem naturalmente em combustíveis fósseis como carvão e petróleo (BAMFORTH, 2005).

O mecanismo básico de degradação microbiológica dos hidrocarbonetos de petróleo é a oxidação dos anéis aromáticos, tendo como produto final dióxido de carbono e água (MELLO; AZEVEDO, 1998). O petróleo é constituído por uma mistura complexa de compostos orgânicos com alto conteúdo energético. O petróleo contém hidrocarbonetos que variam de moléculas simples, como metano, a moléculas com alta massa molecular (ATLAS, 1981). A fração saturada do petróleo compreende os n-alcanos que são considerados os mais facilmente degradáveis. Já a degradação de compostos aromáticos e poliaromáticos é mais complexa. Em ambientes marinhos, a biodegradação dos hidrocarbonetos é geralmente limitada pelas baixas concentrações de oxigênio, fosfato e nitrogênio.

A persistência dos hidrocarbonetos de petróleo no ambiente depende de vários fatores como: estrutura química, concentração e dispersão do contaminante no ambiente (ATLAS, 1981; BAMFORTH, 2005; MILLE et al., 2006). Em adição, fatores ambientais como tipo e estrutura do solo, pH, temperatura, presença de níveis adequados de oxigênio, nutrientes e água para atividade das comunidades microbianas degradadoras e o tempo de persistência dos hidrocarbonetos de petróleo no ambiente, são fundamentais para avaliar o impacto causado ao ambiente e remediá-lo (BAMFORTH, 2005). A biodegradação por microrganismos naturais representa um dos mecanismos primários pelos quais hidrocarbonetos de petróleo são eliminados do meio ambiente. (ATLAS; AZEVEDO, 1981).

A presença de petróleo em ambientes marinhos pode inibir o crescimento de plantas, levando ao aumento da erosão e perda de fertilidade, e deixando o lençol de água vulnerável à contaminação pelo petróleo (EL-TARABILY, 2002). A biodegradação de petróleo em ambientes marinhos pode ser estimulada utilizando-se bactérias nativas capazes de degradar componentes do petróleo ou diretamente pelo bioaumento de halófilos (organismos de ambientes marinhos) ou halotolerantes.

A capacidade de certos microrganismos utilizarem os hidrocarbonetos como fonte de carbono foi demonstrada primeiramente por Zobell (1946), o qual verificou que esses organismos eram amplamente distribuídos na natureza. Zobell (1946) descreveu mais de 100 espécies bacterianas representando 30 gêneros diferentes capazes de degradar petróleo. Posteriormente, Bartha e Atlas (1977) expandiram esta lista em 22 gêneros de bactérias, 1 de alga e 14 de fungos isolados em ambientes aquáticos.

Os microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos estão amplamente distribuídos nos oceanos. Vários são os gêneros de bactérias presentes no mar responsáveis pela degradação do petróleo (MORENO; BERRA; SANTOS, 2004), dentre elas *Pseudomonas*. Estudos recentes indicam que microrganismos halofílicos podem ter grande potencial na degradação de poluentes. Uma arquea halofílica (Linhagem EH4) foi identificada como sendo capaz de degradar cadeias de n-alcanos e hidrocarbonetos aromáticos em ambientes de alta concentração salina (NICHOLSON; FATHEPURE, 2004). Uma espécie de Gamaproteobactéria (*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*) é capaz de degradar vários hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (NICHOLSON; FATHEPURE, 2004). Kuznetnov et al. (1992) isolou de solos contaminados com óleo na Rússia uma bactéria halotolerante, *Streptomyces* sp, com capacidade de degradar o petróleo bruto. Estas observações são evidências de que n-alcanos, PAH e outros componentes aromáticos simples podem ser degradados por microrganismos em ambientes diversos (NICHOLSON; FATHEPURE, 2004).

A contaminação de ambientes marinhos por hidrocarbonetos de petróleo ocasiona aumento na atividade e abundância de microrganismos degradadores e, conseqüentemente, diminuição da diversidade microbiana, alterando a estrutura das comunidades microbianas, e podendo afetar a função e a integridade do ecossistema (NYMAN, 1999; von CANSTEIN et al., 2002; EL-TARABILY, 2002).

A influência da contaminação de petróleo sobre as comunidades microbianas de um solo de mangue do rio Iriri (Bertioga-SP) foi avaliada por Cury (2002). O autor verificou que as estruturas das comunidades de bactérias e arqueas em diferentes pontos de uma transeção foram mais similares entre si do que entre diferentes profundidades em um mesmo ponto. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações na estrutura das comunidades de bactérias e arqueas em solo de mangue do rio Iriri contaminado com petróleo, identificando e comparando as comunidades bacterianas de uma mesma transeção contaminado em duas épocas diferentes.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Área de Estudo

A área de estudo localiza-se no manguezal do Rio Iriri, Canal de Bertioga (Bertioga, SP), compreendida entre 46° 12' 28'' e 46° 12' 29'' de longitude Oeste e 23° 43' 49'' e 23° 53' 43'' de latitude Sul (Anexo A e B). O rio Iriri, desemboca no Canal de Bertioga, principal corpo hídrico da região, com uma extensão de 25Km, entre a foz do rio Diana e a cidade de Bertioga (LAMPARELLI, 1998).

Este manguezal foi contaminado em 1983 por um derramamento de 3.500 m³ de petróleo de um dos oleodutos da Petrobrás, durante a construção da estrada Rio-Santos nas proximidades do Km 93. Vários trabalhos descreveram o impacto do petróleo neste ecossistema (LAMPARELLI, 1997; RODRIGUES et al., 1989a, 1989b, 1990, PONTE et al., 1987).

Aspectos mineralógicos, físico-químicos e a classificação dos solos do manguezal do Rio Iriri foram determinados por Gamero (2001), classificando os solos nos pontos P1, P2 e P3 como ORGANOSSOLO TIOMÓRFICO Hêmico térreo, ORGANOSSOLO TIOMÓRFICO Fábico térreo e GLEISSOLO TIOMÓRFICOS Hístico típico, respectivamente, seguindo a classificação brasileira descrita pela Embrapa. Este mesmo estudo mostrou que a salinidade deste manguezal é muito elevada (variando de 5.4 a 30.6mS/cm), devido a influência do mar na margem do rio e à tortuosidade dada pelos canais de maré. As espécies arbóreas encontradas neste local são: *Rhizophora mangle*, *Avicennia shaueriana* e *Laguncularia racemosa*. A distribuição das espécies vegetais no mangue obedece um padrão de acordo com a salinidade dos horizontes superficiais e o microrelevo (Gamero, 2001).

Posteriormente, Cury (2002) avaliou a diversidade metabólica e genética da comunidade microbiana deste solo, e observou que as comunidades bacterianas eram mais similares entre as entre as profundidades avaliadas do que entre os pontos.

2.2.2 Amostragens

As amostragens deste trabalho foram feitas com base nos trabalhos de Gamero (2001) e Cury (2002) na mesma transeção (300m), em abril de 2004. Os pontos de amostragem foram denominados: "P1" a 30 m do início da transeção, zona inicial da área do manguezal no ponto

mais próximo à margem do rio Iriri, chamada zona da margem; “P2”, a 160m do início da transeção, zona intermediária localizada entre a margem e a encosta, denominada zona alagada; e “P3”, a 300 m do início da transeção, área mais próxima do derramamento e mais distante do leito do rio Iriri, no contato mangue-encosta (Figura 2). Os pontos P1, P2 e P3 amostrados neste trabalho coincidem com os pontos G3, G16 e G30 de Gamero (2001) e P1, P2 e P3 de Cury (2002). Foram realizadas 3 repetições por ponto de amostragem.

As amostras foram coletadas utilizando-se tubos de PVC com 100 cm de comprimento e 7 cm de diâmetro até 1 m de profundidade. Os perfis foram levados ao laboratório e estratificados em subamostras representando as camadas 0-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60cm (Anexo C e D). As subamostras utilizadas para análise química e microbiológica foram armazenadas em sacos plásticos a 4°C. As amostras para análise molecular foram acondicionadas em tubos de polietileno esterilizados de 1,5 mL e armazenados a -80° C.

O pH foi medido durante a estratificação utilizando-se um potenciômetro portátil (Hanna Instruments).

Figura 2 - Esquema dos pontos de amostragem do manguezal do Rio Iriri contaminado com petróleo (Fonte: Gamero, 2002)

2.2.3 Análises laboratoriais

2.2.4 Carbono na biomassa microbiana

Das subamostras 0-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-50, 50-60 cm, retiraram-se duas alíquotas de 10g de solo para determinação da quantidade de carbono em biomassa microbiana (CB) pelo método de fumigação-extração (VANCE et al., 1987). A primeira alíquota foi fumigada em dessecador contendo um béquer com pérolas de vidro e clorofórmio. O clorofórmio foi evaporado sob vácuo. Depois de 24 horas foi retirado o resíduo de clorofórmio do dessecador. A segunda alíquota serviu de controle (não-fumigada). As amostras foram adicionado 40 mL de K_2SO_4 0,5 mol L⁻¹ e as mesmas foram agitadas por 30 minutos. A suspensão resultante foi filtrada em papel de filtro Whatman nº1. O carbono orgânico dos extratos foi determinado por digestão de 10 mL do filtrado com 1 mL de $K_2Cr_2O_7$ e 10 mL de uma mistura de H_2SO_4 e H_3PO_4 concentrados (1:1, v:v), em erlenmeyers de 50 mL. Esta solução permaneceu em banho-maria a 90° C por 1 hora. Após serem resfriadas, as amostras receberam 10mL de H_2O desionizada. O excesso de $K_2Cr_2O_7$ foi determinado por titulação com sulfato ferroso de amônio, utilizando-se fenilamina sulfonato de bário como indicador. O CB foi calculada pela seguinte equação:

$$C\text{-biomassa} = 2,64 Ec$$

$$Ec = (C\text{-orgânico extraído de solos fumigado}) - (C\text{-orgânico extraído de solo não fumigado})$$

Os dados foram expressos em μg de C g⁻¹ de solo seco.

2.2.5 Análises químicas

Para realização das análises químicas, o solo foi primeiramente seco em estufa a 50°C, moído e peneirado em peneira de 0,2mm.

2.2.5.1 Matéria orgânica (MO)

Das subamostras de solo seco, alíquotas de 1g foram colocadas em frascos de vidro. Foi adicionado 10 mL de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e agitado por 15 minutos. As amostras ficaram em repouso por 1 hora. Após esse período, foi adicionado 50 mL de água destilada sob agitação, ficando em repouso durante 12 horas para decantação do solo. A concentração da MO

foi determinada por espectrofotometria a 660 nm e calculada por meio de curva padrão com teores de MO determinados pelo método de titulação (CANTARELLA; QUAGGIO; van RAIJ, 2001).

Os dados foram expressos em g dm^{-3} de solo seco.

2.2.5.2 Nitrogênio, carbono e enxofre

As concentrações de nitrogênio total (N-total), enxofre total (S-total) nas subamostras das camadas 0-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-50 e 50-60 cm, foram determinadas em analisador elementar NC Soil Analyzer Flash EA 1112 (Thermo Electron Corporation) utilizando-se 0.1g de solo.

Para tanto, as subamostras foram secas, homogeneizada e peneiradas em peneira 0,2mm. Alíquotas de 0.1g de amostra foi utilizado no avaliador. Os dados foram expressos em porcentagem.

2.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE)

2.2.6.1 Extração do DNA total do solo

O DNA total do solo foi extraído de amostras das camadas de 0-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 e 50-60 cm. Para extração do DNA foi utilizado o Kit FastDNA Spin For Soil (Q-Biogene). Em microtubos contendo granada finamente moída, foi adicionado 0,5 g de solo, 978 μL de tampão fosfato e 122 μL de Tampão MT. Os tubos foram agitados por 30 s a 4 m s^{-1} em um homogeneizador FP120 FastPrep Cell Disruptor (Q-Biogene). Em seguida foi centrifugado por 1 minuto a 13000 g. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo. A essa solução adicionou 250 μL de Tampão PPS e agitou-se os tubos 10 vezes por inversão. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 13000 g e o sobrenadante coletado e transferido para um microtubo limpo. Ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de matriz de ligação, agitou-se os tubos durante 2 minutos por inversão. Em seguida, os tubos foram incubados por 3 minutos a 37°C . A matriz de ligação foi transferida para um filtro acoplado a um microtubo (Spin Filter, Q-Biogene) e centrifugada por 2 minutos a 13000 g. A matriz foi lavada com 500 μL de solução SEWS, e o filtro centrifugado duas vezes por 2 minutos a 13000 g. Após 5 minutos de incubação á

temperatura ambiente, adicionou-se 50 µL de água ultra pura ao filtro e centrifugou-se por mais 2 minutos a 13000 g. A solução de DNA foi transferida para um tubo limpo e o DNA foi quantificado por densitometria, após eletroforese em gel de agarose 1% e comparação com o padrão de massa (Low DNA Mass Ladder-Invitrogen).

2.2.6.2 PCR

A amplificação da região V3 do rDNA 16S de *Bacteria* foi feita em solução contendo: 2,5 µL de tampão para PCR 10X, 0,2 mM dNTP, 3 mM de MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase recombinante (Gibco), 10 ng de DNA total, 5 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores BA338fgc (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA 3') e UN518r (ATT ACC GCG GCT GCT GG), água Milli-Q esterilizada para um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) nas seguintes condições: 95° C por 5 min, 30 ciclos de 92° por 1 min, 55° C por 1 min e 72° C por 1 min, 72° C por 10 minutos.

Os produtos da reação de amplificação (amplicons) foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1% - TBE 0,5X. O DNA foi visualizado por coloração com SYBR- Green1 (Molecular Probes) utilizando-se um densitômetro a laser 'FluorImager SI' (Armstrong Biosciences). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Os amplicons do rDNA foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE).

Para amplificação inicial de fragmentos específicos do rDNA de 16S de *Archaea* foram utilizados os iniciadores: Arch21F (5' TTCYGGTTGATCCYGCCIGA 3') e Arch958R (YCCGGC GTT GA(IC) TCC AAT T 3') e os iniciadores Arch340F (5'CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC CTA CGG CGY GCA SCA 3') e 519R (5' TTA CCG CGG CKG CTG 3'), em uma segunda reação de amplificação. As condições da primeira e segunda amplificações foram 95 °C, por 5 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 53 °C por 30 segundos e 72 °C por um minuto; 72 °C por 6 minutos. A quantificação dos amplicons resultantes foi feita como descrito acima para *Bacteria*.

2.2.6.3 DGGE

Os amplicons do rDNA 16S foram separados por DGGE. Os géis de acrilamida (37,5: 1; m:m) 8%, foram preparados com gradiente desnaturante 15% a 55%, usando uma solução desnaturante 100% (7M uréia e 40% formamida) e uma solução 0% (sem uréia e formamida) (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi realizada a 60 °C e 200 V constantes por 3 horas, em um sistema DCode (BioRad), utilizando-se solução tampão 0,5X TAE. Após a eletroforese, o gel foi imerso em solução de ácido acético 10% por 10 min, metanol 50% por 10 min e SYBR-Green I (Molecular Probes) 1:10.000 (v:v) por 30 min, utilizando-se um agitador horizontal. Entre cada solução o gel foi lavado 3 vezes com água por 5 min. A imagem do gel foi capturada por varredura, utilizando-se um densitômetro à laser FluorImager e o programa Fragment Analysis (Amersham Biosciences). A riqueza de amplicons (Sa) foi determinada com base no número de bandas com diferentes valores de migração relativa (Rf), detectadas após varredura.

2.2.6.4 Análises estatísticas

A similaridade entre as estruturas de comunidades de *Bacteria* e *Archaea* foi determinada com base na presença ou ausência de amplicons detectados após DGGE. Os géis foram analisados utilizando o programa Diversity Database para determinação da riqueza de amplicons (Sa), com base no número total de bandas detectáveis, em função da profundidade nos três 3 diferentes pontos amostrados. O agrupamento hierárquico foi realizado através do programa Systat 8.0, com base em matrizes de similaridade geradas pelo método de concordância simples (“simple matching”), utilizando-se o algoritmo de Ward e a distância euclidiana como unidade de medida.

2.2.7 Bibliotecas de rDNA 16S

2.2.7.1 Amostras

Para construção das bibliotecas de clones da região V1-V3 do rDNA 16S de *Bacteria*, foram selecionadas amostras que continham petróleo em elevadas concentrações. Como o

petróleo era mais abundante nas camadas superficiais (0-30 cm) nos pontos P2 e P3, foram selecionadas subamostras das camadas 0-5, 5-10, 10-20 e 20-30 cm do ponto P2 coletadas por Cury em 2000 (CURY, 2002) e do Ponto P2 deste estudo para a construção das bibliotecas.

2.2.7.2 Extração de DNA metagenômico do solo

Para extração do DNA metagenômico do solo, foi utilizado o Kit FastDNA Spin For Soil (Q-Biogene) conforme descrito no item 2.2.6.1.

2.2.7.3 Amplificação do rDNA 16S

Para amplificação da região V1-V3 do rDNA 16S de *Bacteria*, foram utilizados os seguintes iniciadores: PRBA63f (5'GGA TCC CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') e UN518r (ATT ACC GCG GCT GCT GG). A amplificação foi realizada conforme descrito no item 2.2.6.2. Os produtos de PCR foram purificados com o Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification, conforme as instruções do fabricante (Armstrong Biosciences).

2.2.7.4 Clonagem dos amplicons

Os amplicons da região V1-V3 do rDNA 16S obtidos foram clonados no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega). A reação de ligação foi feita utilizando-se tampão de ligação rápida 1X (30 mM Tris-HCl pH7.8, 10 mM DDT, 1 mM ATP, 5% polietilenoglicol-PEG) e 3 U de T4 DNA ligase. Esse material foi incubado a 4 °C durante a noite. Em seguida, os produtos da reação de ligação foram transformados em células competentes de *E.coli* DH5 α por meio de choque térmico. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo ampicilina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo; 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As bactérias contendo plasmídeos recombinantes foram cultivadas em meio LB líquido contendo ampicilina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) durante 22 horas a 38 °C.

2.2.7.5 Extração de plasmídeos

Após o cultivo das bactérias, o meio de crescimento foi centrifugado a 4000 *g* por 5 minutos a 4 °C. O pélete obtido foi lavado com uma solução tampão 25mM Tris-HCl (pH8,0), EDTA (pH 8,0) e 50 mM glicose. Em seguida uma solução contendo 1% SDS e 0,2N NaOH foi adicionada e a suspensão incubada em gelo por 10 minutos. Uma solução contendo acetato de potássio 3M, ácido acético glacial 10% foi adicionada e misturada por inversão. A suspensão foi incubada por 10 minutos em gelo e centrifugada a 4000 *g* por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para uma nova placa contendo 15 µg de RNase A, e incubado a 37° C por 20 minutos. O DNA foi precipitado com isopropanol gelado, centrifugado a 4000 *g* a 4 °C por 45 minutos. A lavagem do DNA foi realizada por 5 minutos com etanol 70%. O pélete foi ressuspensionado em 80 µL de água ultra pura esterilizada. O DNA foi quantificado através de espectrofotometria a 260 nm e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%-TBE 0,5X. O DNA foi visualizado por coloração com SYBR-Green I (Molecular Probes) utilizando-se densitômetro a laser “FluorImager SI”(Amersham Biosciences).

2.2.7.6 Seqüenciamento utilizando “Big Dye Terminator”

Uma alíquota contendo de 200-500 ng de DNA plasmidial, 10 pmol dos iniciadores M13F ou M13R, 2,0µl de Dyemanic ET Terminator (Amersham Biosciences), 2,0 µL de tampão Save Money (200 mM Tris-HCL pH 9,0 e 5 mM MgCL₂.6H₂O) e água ultrapura para um volume final de 10µL, foram utilizados para a reação de seqüenciamento. A amplificação foi realizada em um termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf), os produtos de PCR foram precipitados com isopropanol e incubados no escuro por 20 minutos a temperatura ambiente. Após este processo foi realizada a centrifugação e a lavagem do pélete com etanol 70%, o pélete então foi seco no escuro, por no mínimo 2 horas ressuspensionado em formamida e desnaturado a 96° C por 5 minutos. O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático o ABI 3100 (Applied Biosystems).

2.2.7.7 Análises das seqüências do rDNA 16S

Os cromatogramas gerados pelo seqüenciamento dos clones de rDNA 16S de *Bacteria* foram analisados através do programa PhredPhrap (EWING et al., 1998), para remoção de seqüências do vetor e as bases de baixa qualidade somente seqüências contendo qualidade >20 representando 1 erro a cada 100 bases lidas, foram consideradas para análises posteriores.

A afiliação taxonômica das seqüências foi feita comparando –se as seqüências de rDNA 16S com as seqüências depositadas no Ribossomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>) (versão 9.42), utilizando-se o programa RDPquery (http://simo.marsci.uga.edu/public_db/rdpquery.htm).

O número de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) foi determinados utilizando-se o programa DOTUR (Distance Based OTU and Richness Determination) (SCHLOSS et al., 2005). Para tanto, as seqüências foram alinhadas utilizando o programa Clustal X 1.83 (THOMPSON et al., 1997) com os parâmetros “gap-opening penalty” de 10.0 e “gap-extention penalty” de 0.1. O alinhamento foi utilizado para calcular uma matriz de distância evolutiva através do DNADIST, programa do pacote PHYLIP 3.63, usando o algoritmo de Jukes–Cantor (Chao; Shen -<http://evolutiongenetics.washington.edu/phyilip.html>).

As estimativas de riqueza de UTOs considerando distância evolutiva de 0.01 e 0.03 para definição de UTOs, foram feitas pelo programa SPADE, utilizando métodos não-paramétricos ACE (Abundance-based Coverage Estimator) e Chao1 (Chao; Shen, <http://chao.stat.nthu.esdu.tw>). Os índices de diversidade de Shannon e Recíproco de Simpson e a cobertura de amostragem também foram determinados utilizando-se o programa SPADE

As bibliotecas de rDNA 16S foram comparadas utilizando-se o programa S-Libshuff (SINGLETON et al, 2001) (<http://www.arches.uga.edu/~whitman/libshuff.html>), o qual determina o nível de probabilidade de duas bibliotecas diferentes entre si com base em curvas de coberturas homólogas e heterólogas.

2.3 Resultados

2.3.1 Carbono na biomassa microbiana (CB)

As médias dos CB nos diferentes pontos e profundidades podem ser vistos na Tabela 1.

Valores de CB apresentaram diferenças significativas somente para o fator PROFUNDIDADE, não havendo diferenças significativas ($p \leq 0,05$) para o fator PONTO ou para a interação PONTO x PROFUNDIDADE (Tabela 2). As amostras da camada de 0-5cm apresentaram valores de CB significativamente maiores ($p \leq 0,05$) do que nas camadas de 40-50 e de 50-60 cm, não diferindo estatisticamente das demais camadas (Figura 2.1).

Figura 2.1 – Carbono na biomassa microbiana (CB) em diferentes profundidades de solo contaminado com petróleo. Os dados são medidas de nove repetições $\pm$ desvio padrão da média. As médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença estatística significativa (Teste de Tukey, $p \leq 0.05$)

Tabela 1 – Valores C na biomassa microbiana (CB), matéria orgânica (MO), carbono total (C-total), nitrogênio total (N-total), enxofre total (S-total) e pH em solo de mangue contaminado com petróleo

Ponto	Profundidade (cm)	CB ($\mu\text{g C g}^{-1}$)	MO (g dm^3)	S-total (%)	N-total (%)	C-total (%)	pH
P1	0-5	0.30 ± 0.06	77.19 ± 8.97	1.11 ± 0.18	0.33 ± 0.04	6.26 ± 0.77	6.03 ± 0.04
	5-10	0.41 ± 0.03	92.69 ± 10.16	1.43 ± 0.35	0.37 ± 0.05	7.01 ± 1.07	5.90 ± 0.05
	10-20	0.37 ± 0.06	98.58 ± 6.86	1.81 ± 0.15	0.28 ± 0.04	6.68 ± 0.52	6.30 ± 0.04
	20-30	0.43 ± 0.09	103.54 ± 13.27	1.97 ± 0.30	0.32 ± 0.08	7.28 ± 1.65	7.00 ± 0.08
	30-40	0.32 ± 0.17	101.99 ± 26.55	1.75 ± 0.34	0.29 ± 0.09	6.54 ± 2.10	7.27 ± 0.09
	40-50	0.24 ± 0.13	99.51 ± 23.05	1.89 ± 0.37	0.28 ± 0.08	6.42 ± 1.95	7.43 ± 0.08
	50-60	0.22 ± 0.09	100.75 ± 18.49	1.72 ± 0.45	0.27 ± 0.01	6.63 ± 1.01	7.40 ± 0.01
P2	0-5	0.68 ± 0.06	145.08 ± 4.59	1.25 ± 0.32	0.46 ± 0.25	10.83 ± 6.10	6.57 ± 0.25
	5-10	0.41 ± 0.06	126.79 ± 16.47	0.69 ± 0.09	0.36 ± 0.13	8.41 ± 3.34	6.87 ± 0.13
	10-20	0.49 ± 0.09	129.27 ± 8.79	0.82 ± 0.10	0.34 ± 0.12	8.88 ± 4.04	7.27 ± 0.12
	20-30	0.29 ± 0.03	99.82 ± 18.96	1.04 ± 0.12	0.16 ± 0.03	3.42 ± 1.05	7.67 ± 0.03
	30-40	0.22 ± 0.05	85.87 ± 24.10	0.70 ± 0.21	0.33 ± 0.20	7.60 ± 4.94	7.43 ± 0.20
	40-50	0.22 ± 0.06	89.59 ± 19.79	0.81 ± 0.47	0.56 ± 0.15	13.73 ± 2.61	7.53 ± 0.15
	50-60	0.14 ± 0.03	56.11 ± 0.82	0.52 ± 0.14	0.37 ± 0.14	10.13 ± 4.20	7.60 ± 0.14
P3	0-5	0.50 ± 0.12	135.78 ± 4.26	1.09 ± 0.49	0.26 ± 0.02	7.01 ± 0.91	5.80 ± 0.02
	5-10	0.31 ± 0.13	117.18 ± 2.15	1.57 ± 0.25	0.26 ± 0.03	6.29 ± 1.26	5.97 ± 0.03
	10-20	0.23 ± 0.05	115.63 ± 7.21	1.39 ± 0.40	0.16 ± 0.01	3.45 ± 0.44	6.47 ± 0.01
	20-30	0.24 ± 0.06	101.06 ± 6.80	1.52 ± 0.32	0.14 ± 0.03	2.80 ± 0.86	6.93 ± 0.03
	30-40	0.31 ± 0.07	84.63 ± 11.63	1.12 ± 0.39	0.58 ± 0.03	12.15 ± 0.43	7.20 ± 0.03
	40-50	0.17 ± 0.05	77.19 ± 6.86	0.53 ± 0.10	0.50 ± 0.05	11.21 ± 0.85	7.43 ± 0.05
	50-60	0.20 ± 0.03	63.55 ± 9.74	1.57 ± 0.11	0.32 ± 0.02	7.37 ± 0.33	7.63 ± 0.02

Tabela 2 - Análise de variância (ANOVA) das variáveis avaliadas nas amostras de solo de mangue contaminado com petróleo

Causa de variação	Variáveis					
	CB	MO	S	N	C	pH
PONTO	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
PROFUNDIDADE	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PONTO X PROFUNDIDADE	ns	*	n.s.	n.s.	ns	n.s.
C.V. (%)	9.89	0.015	16.28	11.75	27.79	4.33

CB; Carbono na biomassa microbiana; MO: Matéria Orgânica; S: Enxofre total; N: Nitrogênio total; C: Carbono Orgânico total

n.s.= não significativo estatisticamente ($p \leq 0.05$)

2.3.2 Matéria orgânica (MO)

As médias das concentrações de MO nos diferentes pontos e profundidades podem ser vistos na Tabela 1.

A MO apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) para o fator PROFUNDIDADE e interação PONTO x PROFUNDIDADE, não havendo variação em função do fator PONTO (Tabela 2). As amostras da camada de 0-5cm apresentaram valores de MO significativamente maiores ($p \leq 0,05$) do que nas camadas de 40-50 e de 50-60 cm, não diferindo estatisticamente das demais camadas (Figura 2.2). Na camada de 0-5 cm, a concentração de MO nos pontos P2 e P3, foi aproximadamente 2,5 vezes maior do que no ponto P1. Já, na camada de 50-60 cm a concentração de MO no P1 foi aproximadamente 1,6 vezes maior do que nos pontos P2 e P3 (Tabela 1).

Figura 2.2 - Concentração de matéria orgânica (MO) em diferentes profundidades de solo de mangue contaminado com petróleo. P1 (próximo do rio); P2 (zona intermediária) e P3 (mangue-encosta). Os dados são medidas de nove repetições $\pm$ desvio padrão da média. As médias seguidas de letras iguais não apresentaram diferenças estatísticas significativas (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$)

2.3.3 Teor de carbono (C) total

As médias dos teores de C-total nos diferentes pontos e profundidades podem ser vistos na Tabela 1

Os teores de C-total não variaram significativamente ($p \leq 0.05$) para os seguintes fatores analisados: PONTO, PROFUNDIDADE e PONTO X PROFUNDIDADE (Tabela 2).

2.3.4 Teor de nitrogênio (N) total

As médias dos teores de N-total nos diferentes pontos e profundidades podem ser vistos na Tabela 1.

Os teores de N-total não variaram significativamente ($p \leq 0.05$) para os seguintes fatores analisados: PONTO, PROFUNDIDADE e interação PONTO X PROFUNDIDADE (Tabela 2).

2.3.5 Teor de enxofre total (S-total)

As médias dos teores de S-total nos diferentes pontos e profundidades podem ser vistos na Tabela 1.

Os teores de S-total no solo foram significativamente afetados pelo fator PONTO ($p \leq .05$) não variando em função da PROFUNDIDADE ou da interação PONTO X PROFUNDIDADE (Tabela 2). O teor de S-total no P1 foi 1.3 e 2 vezes maior que nos pontos P2 e P3, respectivamente (Figura 2.3).

2.3.6 pH

Os valores de pH apresentaram diferenças estatísticas ($p \leq 0.05$) para os seguintes fatores analisados: PONTO, PROFUNDIDADE e interação PONTO X PROFUNDIDADE (Tabela 1)

Figura 2.3 – Enxofre total (S-total) nos diferentes pontos de uma transeção de solo de mangue contaminado com petróleo. P1 (próximo à margem do rio); P3 (próximo ao local de derramamento) e P2 (ponto intermediário, zona de alagamento). Os dados são medidas de vinte e uma repetições $\pm$ desvio padrão da média. As médias seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatística significativa (Teste de Tukey, $p \leq 0.05$)

2.3.7 Estrutura das comunidades de *Bacteria*

Na figura 3 é apresentada a separação dos amplicons de rDNA 16S de *Bacteria* por DGGE. Os géis foram analisados utilizando o programa Diversity Database para determinação da riqueza de amplicons (S_a), com base no número total de bandas detectáveis, em função da profundidade nos três diferentes pontos amostrados.

A análise do gel possibilitou a detecção de 87 bandas distintas nas amostras avaliadas. Na Figura 3.2, é possível observar uma diminuição da riqueza de amplicons em função do aumento da profundidade, para os três pontos analisados. Em média na camada de 0-10 cm foram observados aproximadamente 41% do total de amplicons, enquanto que nas camadas 10-20 e 20-30 cm foram observados 31% e 24% do total de amplicons (Figura 3.2).

A análise dos dados por agrupamento hierárquico mostrou que as comunidades bacterianas nos diferentes pontos são mais similares entre si do que entre as profundidades em um mesmo ponto, ou seja, estruturas das comunidades de bactérias nas camadas de 0-10 cm dos

pontos P1, P2 e P3 são mais similares entre si do que as estruturas das comunidades de bactérias das camadas 10-20 e 20-30 cm, dos mesmos pontos (Figura 3.3).

Figura 3 - Riqueza de amplicons (Sa) do rDNA 16S *Bactéria*, com base no número de bandas detectadas após separação por DGGE. Os dados apresentam a média de três repetições $\pm$ desvio padrão da média

2.3.8 Estrutura das comunidades de *Archaea*.

Na figura 4.1 é mostrada a separação dos amplicons da região V3 do rDNA 16S de *Archaea* por DGGE. A análise do gel possibilitou a detecção de 88 bandas distintas nas amostras avaliadas. A riqueza de amplicons (Sa) para os grupos *Bacteria* e *Archaea* apresenta comportamento distinto em função da profundidade. Na Figura 4.2, observa-se um aumento da Sa com o aumento da profundidade. Amostra da camada de 0-5 cm apresentaram menor Sa do que amostras da camada 30-40 cm, em todos os pontos avaliados.

A análise de agrupamento hierárquico baseada nos perfis de bandas detectadas após DGGE mostrou que as comunidades bacterianas se agruparam em função da profundidade independente dos pontos de amostragem (Figura 4.3). Os dados mostraram que a estrutura da comunidade de arqueas nas camadas 0-10 cm dos pontos P1, P2 e P3 são mais similares entre si do que nas amostras 10-30, 20-30 e 30-40.

Figura 3.1 - Amplicons na região V3 do rDNA 16S de *Bacteria*, após separação por DGGE. P1, próximo à margem do rio; P2, ponto intermediário entre P1 e P3 e P3, próximo ao local de derramamento

Figura 3.3 – Agrupamento hierárquico com base na separação de ampliconss de rDNA 16S de *Bacteria* por DGGE. As amostras representam as camadas 0-10, 10-20 e 20-30 cm nos três pontos amostrados. R1, R2 e R3 representam as repetições

Figura 4.1 – Amplicons da região V3 do rDNA16S de *Archaea*, após separação por DGGE. P1, ponto próximo à margem do rio; P2, ponto intermediário entre P1 e P3; P3, ponto próximo ao local de derramamento

Figura 4.2 - Riqueza de amplicons (S_a) do rDNA 16S *Archaea*, com base no número de bandas após DGGE. Os dados apresentam a média de três repetições $\pm$ desvio padrão da média

Figura 4.3 - Agrupamento hierárquico com base na separação de ampliconss de rDNA 16S de *Archaea* por DGGE. As amostras representam as camadas 0-5, 5-10, 10-20 20-30 e 30-40 cm nos três pontos amostrados (P1, P2 e P3)

2.3.9 Seqüenciamento do rDNA 16S de *Bacteria*

A diversidade de *Bacteria* no manguezal do rio Iriri foi analisada através do seqüenciamento da região V1-V3 do rDNA 16S, amplificada a partir do DNA metagenômico do solo. Foram analisadas amostras da camada de 0-30 cm dos pontos P1, P2 e P3 coletadas em 2000 (CURY, 2000), e do ponto P2 coletadas em abril 2004. Das amostras coletadas em 2000 229, 205 e 176 seqüências de clones de rDNA 16S dos pontos P1, P2 e P3, respectivamente, foram analisadas. Da coleta de abril de 2004, foram analisadas 185 seqüências de clones de rDNA 16S do ponto P2.

A afiliação filogenética das seqüências parciais de rDNA 16S foi feita utilizando-se o programa RDPquery. Os resultados da afiliação filogenética indicaram a presença de dez filos distintos distribuídos entre as amostras estudadas (Figura 5A).

Dentro do domínio *Bacteria*, os dois filos mais predominantes em todas as amostras coletadas em 2000 foi *Proteobacteria*, representando aproximadamente 76,6%, 73,8% e 78,1% do total de seqüências analisadas em P1, P2 e P3, respectivamente. Em P2(2004) o filo *Proteobacteria* representou 56,8% das seqüências avaliadas. O filo *Bacteroidetes*, representou 12,8%, 12% e 10% das seqüências analisadas em P1(2000), P2(2000) e P3 (2000) respectivamente, e 21,3% em P2(2004) (Figura 5A).

Nas amostras coletadas em 2000, nos pontos P1 foi detectado seis filos enquanto que em P2 e P3 foram detectados sete filos. Já, na amostra de P2 coletada em 2004 foram detectadas representantes de nove filos (Tabela 3).

Os filos *Firmicutes* e *Chloroflexi*, também apresentam representantes em todas amostras avaliadas, sendo que *Firmicutes* representou aproximadamente 7,1%, 1% e 2,8% das seqüências analisadas em P1 P2 e P3 da coleta de 2000, respectivamente, e 2,9% no ponto P2 da coleta de 2004 (Figura 5A). *Chloroflexi* representou 4,6% em P1 e 5,6% em P2 e P3 coletados em 2000, e 7,1% das seqüências analisadas para o ponto P2(2004).

Representantes do filo *Fusobacteria* foram detectados somente em P2(2000) e do filo *Acidobacteria* em P2(2004) representando 0,5% das seqüências analisadas (Figura 5A).

O filo *Proteobacteria* apresentou representantes das cinco classes, destacando-se *Gammaproteobacteria*, a qual representou aproximadamente 45,5% das seqüências analisadas, sendo que P1(2000), P2(2000), P3(2000) representaram 39,7%, 52,9% e 49,9% e P2 (2004) e 39,6% do total de seqüências de bactérias (Figura 5B). A classe *Deltaproteobacteria* representou 32%, 8,2% e 27,1% das seqüências analisadas em P1(2000), P2(2000) e P3(2000), respectivamente, e 36,7% em P2(2004) (Figura 5B). *Epsilonproteobacteria* representou 11,7%, 7,3% e 10,2% das seqüências analisadas em P1(2000), P2(2000) e P3(2000) respectivamente, e 1,4 em P2(2004)(Figura 5B). A classe *Betaproteobacteria* apresentou menor freqüência de táxon dentro da classe *Proteobacteria*, representando aproximadamente 1,5% das seqüências analisadas em P1, P2 e P3 coletados e 2000, e 4,4% em P2(2004).

Figura 5 – Frequência de diferentes taxa de *Bacteria*, em mangue contaminado com petróleo, com base na afiliação filogenética do RDPquery. A, filos, B, classes de Proteobacteria. C, classe de *Bacteroidetes*. P1, como zona inicial a área do manguezal no ponto mais próximo a margem do rio Iriri,; P2, zona intermediária (denominada zona alagada); P3 zona de contato mangue-encosta; (2000), amostras coletadas em abril de 2000; (2004), amostras coletadas em abril de 2004

Tabela 3 –Frequência (%) dos diferentes taxa de *Bacteria*, encontrados em solo de mangue contaminado com petróleo

								continua
Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	P1 (2000)	P2 (2000)	P3 (2000)	P2(2004)
Acidobacteria	ND	ND	ND	ND	0.0	0.0	0.0	0.5
Acidobacteria	Acidobacteria	ND	ND	ND	0.0	0.0	0.0	0.5
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	ND	ND	0.0	0.0	0.0	0.5
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobacterium	0.0	0.0	0.0	0.5
Actinobacteria	ND	ND	ND	ND	1.5	1.1	2.6	1.1
Actinobacteria	Actinobacteria	ND	ND	ND	1.5	0.0	2.6	1.1
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinobacteridae	ND	ND	0.0	0.0	2.6	0.0
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinobacteridae	Acidobacteriaceae	ND	0.0	0.0	2.6	0.0
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	0.0	0.0	0.0	0.5
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Rubrobacteraceae	ND	0.0	0.0	0.0	0.5
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Rubrobacteraceae	Conexibacter	0.0	0.0	0.0	0.5
Bacteroidetes	ND	ND	ND	ND	13.3	12.0	10.3	17.8
Bacteroidetes	Bacteroidetes	ND	ND	ND	3.0	2.2	1.9	3.2
Bacteroidetes	Bacteroidetes	Bacteroidales	ND	ND	0.7	1.1	1.9	2.7
Bacteroidetes	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	ND	0.7	1.1	1.3	1.1
Bacteroidetes	Flavobacteria	ND	ND	ND	0.7	1.1	1.9	7.0
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	ND	ND	0.0	1.1	0.6	6.5
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	ND	0.0	1.1	0.6	4.9
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	0.0	0.0	0.0	0.5
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Gramella	0.0	0.0	0.0	0.5
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Robiginitalea	0.0	1.1	0.6	0.5
Bacteroidetes	Sphingobacteria	ND	ND	ND	1.5	0.0	0.0	1.1
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	ND	ND	0.7	0.0	0.0	1.1
Chloroflexi	ND	ND	ND	ND	4.4	2.2	6.4	6.5
Chloroflexi	Anaerolineae	ND	ND	ND	3.0	2.2	6.4	6.5
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolinaeles	ND	ND	2.2	0.0	5.8	5.9
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolinaeles	Anaerolineaceae	ND	1.5	0.0	5.8	5.4
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolinaeles	Anaerolineaceae	Anaerolinea	0.7	0.0	2.6	3.8
Deferribacteres	ND	ND	ND	ND	2.2	3.3	1.9	3.2

Tabela 3 –Frequência (%) dos diferentes taxa de *Bacteria* encontrados em solo de mangue contaminado com petróleo

(continuação)

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	P1 (2000)	P2 (2000)	P3 (2000)	P2 (2004)
Deferribacteres	Deferribacteres	ND	ND	ND	1.5	2.2	1.9	2.7
Deferribacteres	Deferribacteres	Deferribacterales	ND	ND	0.0	1.1	1.3	1.6
Deferribacteres	Deferribacteres	Deferribacterales	Incertae sedis 3	ND	0.0	1.1	1.3	1.6
Deferribacteres	Deferribacteres	Deferribacterales	Incertae sedis 3	Caldithrix	0.0	1.1	0.0	0.5
Firmicutes	ND	ND	ND	ND	2.2	6.5	1.3	2.2
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND	ND	0.0	0.0	0.0	1.1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	ND	0.0	0.0	0.0	1.1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0.0	0.0	0.0	1.1
Firmicutes	Clostridia	ND	ND	ND	2.2	3.3	0.6	1.6
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	ND	ND	1.5	1.1	0.6	1.6
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	ND	0.7	0.0	0.0	1.6
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium	0.0	0.0	0.0	1.6
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae		0.7	0.0	0.0	0.0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Fusibacter	0.7	0.0	0.0	0.0
Fusobacteria	ND	ND	ND	ND	0.0	2.2	0.0	0.0
Fusobacteria	Fusobacteria	ND	ND	ND	0.0	2.2	0.0	0.0
Fusobacteria	Fusobacteria	Fusobacteriales	ND	ND	0.0	2.2	0.0	0.0
Nitrospira					0.0	0.0	0.0	5.4
Nitrospira	Nitrospira	ND	ND	ND	0.0	0.0	0.0	5.4
Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	ND	ND	0.0	0.0	0.0	4.9
Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	ND	0.0	0.0	0.0	4.3
Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Magnetobacterium	0.0	0.0	0.0	2.2
Gemmatimonadetes					0.0	0.0	0.6	0.5
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	ND	ND	ND	0.0	0.0	0.6	0.5
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	ND	ND	0.0	0.0	0.6	0.5
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	ND	0.0	0.0	0.6	0.5
Proteobacteria					76.3	72.8	76.9	47.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND	ND	ND	8.1	15.2	7.7	7.0

Tabela 3 –Frequência (%) dos diferentes taxa de *Bacteria* encontrados em solo de mangue contaminado com petróleo

(continuação)

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	P1 (2000)	P2 (2000)	P3 (2000)	P2 (2004)
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	ND	ND	0.0	1.1	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	ND	0.0	1.1	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	5.9	3.3	3.8	3.8
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	ND	3.0	0.0	0.6	1.1
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Hyphomicrobium	0.0	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Rhodoplanes	0.0	0.0	0.6	0.5
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	ND	0.7	2.2	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	Mesorhizobium	0.7	0.0	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	Methylocystis	0.0	0.0	0.6	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	ND	ND	0.7	0.0	1.3	1.1
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	ND	0.7	0.0	1.3	1.1
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Rhodobacter	0.0	0.0	0.6	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	ND	ND	0.7	3.3	1.3	1.1
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	ND	0.0	2.2	1.3	1.1
Proteobacteria	Betaproteobacteria	ND	ND	ND	1.5	1.1	0.6	2.2
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	ND	ND	0.0	0.0	0.0	1.1
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	ND	0.0	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Curvibacter	0.0	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	ND	ND	0.0	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	ND	0.0	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	ND	ND	ND	20.7	5.4	19.9	16.8
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	ND	ND	5.2	2.2	9.0	3.2
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	Desulfobacteraceae	ND	4.4	2.2	6.4	1.6
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	Desulfobacteraceae	Desulfonema	0.7	0.0	0.0	0.0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	Desulfobacteraceae	Desulfosarcina	0.0	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonales	Geobacteraceae	ND	0.0	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	ND	ND	3.7	0.0	1.3	0.0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	ND	3.0	0.0	0.0	0.0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	Desulfovira	2.2	0.0	0.0	0.0
Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	ND	ND	ND	8.1	4.3	7.1	1.1

Tabela 3 –Frequência (%) dos diferentes taxa de *Bacteria* encontrados em solo de mangue contaminado com petróleo

(continuação)

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	P1 (2000)	P2 (2000)	P3 (2000)	P2 (2004)
Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	ND	ND	6.7	3.3	6.4	0.5
Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	ND	0.0	1.1	5.8	0.0
Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Helicobacteraceae	ND	4.4	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Helicobacteraceae	Sulfurovum	1.5	0.0	3.8	0.0
Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Helicobacteraceae	Sulfurimonas	0.0	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND	ND	ND	25.9	29.3	35.9	18.4
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	ND	ND	3.7	0.0	2.6	2.2
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	ND	0.0	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Alteromonas	0.0	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Incertae sedis 7	ND	1.5	0.0	1.3	1.6
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Incertae sedis 8	Marinobacterium	0.0	0.0	0.6	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Incertae sedis 7	Microbulbifer	0.7	0.0	0.0	1.6
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	ND	0.7	0.0	0.6	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas	0.7	0.0	0.6	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Psychromonadaceae	ND	0.7	0.0	0.6	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	ND	ND	5.9	2.2	6.4	2.7
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	ND	0.7	1.1	0.6	0.5
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	Thiohalocapsa	0.0	1.1	0.0	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae	ND	3.0	1.1	4.5	1.6
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae	Thiomicrospira	3.0	0.0	0.0	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae	Thioalkalispira	0.0	1.1	2.6	1.1
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	ND	ND	0.0	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND	0.0	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	0.0	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	ND	ND	0.0	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	ND	0.0	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	Methylobacter	0.0	0.0	0.0	0.5
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	ND	0.0	0.0	1.3	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Marinomonas	0.0	0.0	0.6	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	ND	ND	0.0	0.0	0.6	4.9
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	ND	0.0	0.0	0.0	3.2
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	0.0	0.0	0.0	2.7

Tabela 3 –Frequência (%) dos diferentes taxa de *Bacteria* encontrados em solo de mangue contaminado com petróleo

(conclusão)

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	P1 (2000)	P2 (2000)	P3 (2000)	P2 (2004)
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	ND	0.0	0.0	0.6	1.6
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	0.0	0.0	0.6	1.6
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	0.0	0.0	0.6	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	ND	ND	0.7	1.1	1.3	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	ND	0.7	1.1	1.3	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	Thiomicrospira	0.0	1.1	0.0	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	Vibrio	0.7	0.0	0.0	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	ND	ND	1.5	12.0	12.8	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	ND	1.5	12.0	12.8	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio	0.0	5.4	10.9	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio	0.0	0.0	0.6	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio	0.0	0.0	0.6	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio	0.0	0.0	0.6	0.0

P1(2000) – Amostra de ponto próximo ao rio Iriri coletadas em abril de 2000; P2(2000), amostras de ponto intermediário entre P1 e P3 coletadas em abril de 2000; P3(2000), amostra de ponto próximo ao local de derramamento de petróleo coletadas em abril de 2000; P2(2004) amostras de ponto intermediário entre P1 e P3 coletadas em abril de 2004

Tabela 4 – Estimativas de riqueza de OTUs, índice de diversidade e cobertura de amostragem calculados a partir de bibliotecas de rDNA 16S de *Bacteria* de solo de mangue contaminado com petróleo

Comunidade	NS	NU	Estimativa de Riqueza de UTOs		Índices de Diversidade		ECA
			ACE	Chao1	Shannon ^a	1/D ^b	
D = 0,01							
P1(2000)	229	223	4255.6 (2054.7; 9101.2)	4147.1 (1971.8 ;9028.4)	5.39 (5.37; 5.41)	217.4 (192.7; 250)	0.05
P2(2000)	205	199	3399.6 (1649.2; 7262.6)	3303.1 (1575.8 ;7197.2)	5.28 (5.26; 5.30)	193.8 (170.4; 224.2)	0.06
P3(2000)	177	155	1836.5 (1010.8; 3458.7)	1291.1 (713.9 ;2464.3)	4.95 (4.87; 5.02)	116.4 (91; 161.8)	0.19
P2(2004)	185	169	1015.3 (636.3; 1701.7)	1016.0 (633.4 ;1713.9)	5.09 (5.05; 5.13)	1000 (680.3; 1886.8)	0.17
D = 0,03							
P1(2000)	229	219	3539.7 (1821.2; 7101.5)	3929.1 (1870.6 ;8553.2)	5.36 (5.339; 5.398)	207.5 (182.8; 239.8)	0.08
P2(2000)	205	197	2524.1 (1353.3; 4880.3)	2429.6 (1278.3 ;4806.5)	5.26 (5.243; 5.294)	190.1 (167.5; 219.7)	0.08
P3(2000)	177	146	1421.2 (804.5; 2615.5)	1004.1 (576.6 ;1855.7)	4.84 (4.752; 4.938)	207.5 (114.4; 1123.6)	0.26
P2(2004)	185	163	885.3 (567.9; 1451.3)	863.8 (550.5 ;1430.4)	5.04 (4.991; 5.094)	628.9 (421.9; 1250)	0.22

P1(2000) – Amostra de ponto próximo ao rio Iriri coletadas em abril de 2000; P2(2000), amostras de ponto intermediário entre P1 e P3 coletadas em abril de 2000; P3(2000), amostra de ponto próximo ao local de derramamento de petróleo coletadas em abril de 2000; P2(2004) amostras de ponto intermediário entre P1 e P3 coletadas em abril de 2004. NS, número de seqüências. NU, número de UTOs determinado pelo DOTUR. ECA, estimativa de cobertura de amostragem. ^a Estimador de máxima semelhança, ^b Estimador de máxima semelhança, 1/D recíproca do índice de Simpson. Valores entre parêntese representam o intervalo com 95% de confiança

O filo *Bacteroidetes* representa o segundo maior grupo detectado através da afiliação filogenética das seqüências analisadas. As duas classes detectadas em todas as amostras foram *Bacteroidetes* e *Flavobacteria*, sendo que *Bacteroidetes* representou aproximadamente 55,6%, 65,5,7% e 48,5% das suas seqüências analisadas para os pontos P1(2000), P2(2000) e P3(2000), respectivamente, e 28,3% em P2(2004). *Flavobacteria* representou 12,4%, 35,3% e 51,5% em P1, P2 e P3 respectivamente coletadas em 2000, e 60,8% em P2 coletada em 2004. A classe *Sphingobacteria* foi a única que não esteve presente em todos os pontos analisados, representado por P2(2004) e P1(2000) com aproximadamente de 10% e 30% respectivamente, das seqüências analisadas.

Na tabela 4 são apresentadas as estimativas de riqueza de UTOs, os índices de diversidade e a estimativa de cobertura de amostragem. As distâncias evolutivas (D) escolhidas para definição das UTOs (espécies) neste trabalho, foi de 0,01 e 0,03.

As estimativas de riqueza de UTOs, através dos métodos não-paramétricos ACE e Chao1, mostraram que não houve diferença significativa (intervalo de confiança de 95% de probabilidade) entre os pontos P1(2000), P2(2000) e P3(2000), tanto para $D=0,01$ quanto para $D=0,03$. No entanto, houve uma tendência de diminuição de riqueza de UTOs nos pontos mais contaminados com petróleo (P2 e P3), em relação ao ponto menos contaminado (P1). Houve também uma diminuição na riqueza de UTOs no P2(2004) em relação a P2(2000), com base nas estimativas calculadas pelo algoritmo de Chao1 (Tabela 4).

Na figura 6A são mostradas os números de filotipos estimados para diferentes distâncias evolutivas, em amostras dos pontos P1, P2 e P3 coletados em abril de 2000. Os dados indicam que a estimativa de riqueza de OTU para os pontos P1 e P2 não diferiram estatisticamente, independente da distância evolutiva. Já a riqueza de UTOs, no P3 foi significativamente menor do que nos pontos P1 e P2 para $D \geq 0,05$ (Figura 6A). Comparando as riqueza de UTOs das amostras do ponto P2, observou-se que as amostras referentes a 2004 apresentou menor riqueza de OTUs quando comparadas com amostras coletadas em 2000, para $D \geq 0,06$.

Na coleta de 2000, os índices de Shannon e Simpson para os pontos P1 e P2 não apresentaram diferenças significativas. No entanto, esses índices foram significativamente menores para o ponto P3, quando comparado com P1 e P2.

Figura 6 - Número de filotipos de *Bacteria* estimado para diferentes distâncias evolutivas solo de mangue contaminado com petróleo. P1, ponto mais próximo a margem do rio Iriri; P2, zona intermediária; P3, zona de contato mangue-encosta. Dados calculados pelo estimador não-paramétrico Chao1. As barras representam os intervalos de confiança (95% de probabilidade)

Os altos valores da recíproca do índice de Simpson observado para o ponto P2 (2004) indicam a existência de UTOs dominantes dentro da comunidade bacteriana, o mesmo não é observado no P2 amostrado em 2000.

Na Tabela 5 são apresentadas as comparações múltiplas das bibliotecas de clones de rDNA 16S feitas pelo programa S-LIBSHUFF. Os resultados mostram que a comunidade de bactérias do ponto P3(2000) não diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos pontos P1(2000) e P2(2000). Já, as comunidades de bactérias dos pontos P1(2000) e P2(2000) não diferiram entre si.

Os resultados do S-libshuff apresentados na Tabela 6 indicaram que as comunidades de bactérias no P2 em amostras coletadas em 2000 e 2004, foram significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Valores de ‘p’ calculado nas comparações múltiplas entre bibliotecas de rDNA 16S das comunidades de *Bacteria* usando S-libshuff

X	Y		
	P1(2000)	P2(2000)	P3(2000)
P1(2000)	-	0.2115	0.0000*
P2(2000)	0.1500	-	0.0000*
P3(2000)	0.7765	0.0000*	-

P1, próximo à margem do rio; P2, ponto intermediário entre P1 e P3; P3, próximo ao local de derramamento coletados em 2000. X, comparação das curvas de cobertura X homóloga, na coluna. Y, comparação das curvas de cobertura Y homóloga, na linha. Valores mínimos de “p” para diferença significativa: 0.0017 e 0.0085 para 1% e 5% de probabilidade, respectivamente

* Diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Tabela 6 – Valores de ‘p’ calculado nas comparações múltiplas entre bibliotecas de rDNA 16S das comunidades de *Bacteria* usando S-libshuff

X	Y	
	P2(2002)	P2(2004)
P2(2002)	-	0.0000*
P2(2004)	0.0000*	-

P2 - ponto intermediário (zona de alagamento); (2000), amostras coletadas em abril de 2000; (2004), amostras coletadas em abril de 2004. X, comparação das curvas de cobertura X homóloga, na coluna. Y, comparação das curvas de cobertura Y homóloga, na linha. Valores mínimos de “p” para diferença significativa: 0.005 e 0.025 para 1% e 5% de probabilidade, respectivamente

* Diferença significativa ($p \leq 0,05$)

2.4 Discussão

2.4.1 Atributos químicos do solo

Tanto o pH quanto a quantidade de matéria orgânica (MO), temperatura, concentração de nutrientes, vegetação e práticas de manejo podem influenciar as atividades dos microrganismos do solo e as estruturas das comunidades microbianas (SHINGH et al., 2006).

A quantificação da biomassa microbiana é uma das abordagens mais utilizadas em estudos de impactos ambientais sobre a microbiota do solo (STENBERG, 1999). Em torno de 98% do C orgânico do solo encontra-se como MO morta. A fração viva não passa de 1 a 5% do total de MO, dos quais 60 a 80% são microrganismos, de forma que a maior parte da matéria viva do solo é representada pela biomassa microbiana (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). As funções-chaves do solo, como transformações da MO e ciclagem de nutrientes, são controladas pela biomassa microbiana, e podem ficar comprometidas se essa biomassa for reduzida (SPARLING, 1992).

A maior atividade biológica do solo situa-se, de modo geral, na camada de 0 a 20 cm de profundidade, devido ao maior acúmulo de MO, pela disposição de resíduos vegetais e animais, além dos efeitos das raízes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Cury (2002) avaliando a atividade microbiana em solo de mangue do rio Iriri contaminado com petróleo, verificou que as quantidades de carbono na biomassa microbiana (CB) são maiores nas camadas de 0-20 cm de profundidade, e se correlaciona positivamente com os teores de MO, demonstrando a existência de uma maior atividade microbiana nas camadas mais superficiais (SPARLING, 1992). Neste trabalho, a concentração de MO e de CB foram duas vezes mais elevadas nas profundidades de 0-20 cm do que nas profundidades de 50-60 cm, indicando a presença de uma maior quantidade de microrganismos e possivelmente uma maior atividade microbiológica nas camadas mais superficiais do solo de mangue estudado, independente da presença de hidrocarbonetos de petróleo.

Apesar de P3 ser o ponto mais contaminado, a quantidade de CB e MO não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os pontos amostrados. No entanto, efeitos significativos da profundidade de amostragem sobre esses atributos foram observados. Nos pontos P2 e P3, o CB diminuiu com o aumento da profundidade, concomitantemente com a diminuição de MO. No

entanto, no P1 (menos contaminado), a MO aumentou com o aumento da profundidade, enquanto o CB diminuiu.

Esses dados sugerem que existe uma estratificação na distribuição da biomassa microbiana no solo de mangue do rio Iriri, e que no P1 (menos contaminado) a limitação do crescimento da biomassa microbiana nas mesmas profundidades pode não ser devido à disponibilidade de C-orgânico.

As quantidade de S-total variam dependendo da posição do ponto de amostragem na transeção. Em solos alagados como manguezais, o S encontra-se em formas mais reduzidas, como sulfeto de hidrogênio (H_2S), mackinawita (FeS) e pirita (FeS_2). FeS_2 é uma das fontes de S no solo, a qual pode ser oxidada formando sulfato (SO_4^{-2}), e este pode ser assimilado pelas plantas e pelos microrganismos (FERREIRA, 2006).

Os compostos de S são considerados elementos chaves para os ciclos biogeoquímicos ativos em ambientes costeiros alagados (MACKIN; SWIDER, 1989). A dinâmica do S está intimamente ligada a atividade microbiana, através de processos de oxidação e redução. Elevadas concentrações de S em solos de mangue ocorrem devido à ação das marés, onde os rios contribuem com os óxidos ou hidróxidos de ferro e o mar com os sulfatos (ROSSI, 1999).

O teor de S-total foi significativamente menor no P2 do que em P1 ou P3, o que pode ter ocorrido devido à presença de grande quantidade de raízes nessa área, as quais pode ter contribuído para remoção do enxofre no solo.

Neste estudo, os teores de S-total mostraram-se elevados na maioria dos Perfis. P1 (margem do rio), em particular, se destaca por apresentar os valores mais elevados de S-total, em média 1,7%. Ferreira (2002) estudando solo de mangue contaminado com esgoto doméstico (Guarujá –SP), observou que os teores de S variavam de 2% a 3% entre os diferentes pontos amostrados e que esses altos valores eram devido a ação das marés, portanto o ponto mais próximo do rio apresentava maior teor de S.

2.4.2 Diversidade de UTOs de *Bacteria* e *Archaea*

Diversos métodos bioquímicos e moleculares vêm sendo utilizados para investigar a diversidade microbiana e mudanças na estrutura dessas comunidades em solos (SINGH et al., 2006), dentre eles a PCR-DGGE (MUYZER; WAAL, UITIERLINDEN, 1993). Utilizando-se

DGGE, fragmentos de DNA do mesmo tamanho e seqüências de nucleotídeos diferentes podem ser separados em géis de poliacrilamida contendo um gradiente de agentes desnaturantes. Assim, cada banda no gel representa um grupo de microrganismo com a mesma seqüência de nucleotídeos ou seqüências similares como o mesmo comportamento de desnaturação (PROSSER, 2002; SINGH et al., 2006). Um dos genes mais usados para análise de comunidades de procariotos é o gene que codifica o rRNA 16S (rDNA 16S). No entanto, muitas espécies bacterianas possuem mais de uma cópia do rDNA 16S, as quais podem apresentar diferentes mobilidades no gel com gradiente desnaturante, resultando em múltiplas bandas que representam a mesma espécie. Essas limitações da metodologia dificultam a interpretação dos resultados, no que se refere à estimativa de diversidade, mas não invalidam sua utilização para detectar alterações na estrutura das comunidades. O DGGE é mais adequado quando o objetivo é comparar duas ou mais comunidades (MUYZER; WAAL, UITIERLINDEN, 1993). Se as amostras apresentarem padrões de bandamento diferentes, então, certamente as comunidades microbianas apresentam diferenças (BLOON et al., 2000).

A influência do petróleo nas comunidades microbianas do mangue do rio Iriri (Bertioga, SP), vem sendo estudada desde 2000. Cury (2002) observou que o fator determinante para estruturação das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* era a profundidade.

Neste estudo, PCR-DGGE e seqüenciamento de clones de rDNA 16S foram utilizados para avaliar a variação espacial e temporal das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* em solos de mangue do rio Iriri. A avaliação visual e da concentração de hidrocarbonetos de petróleo por cromatografia gasosa nos três pontos da transeção amostrados mostrou que o P3 (mangue-encosta) era o ponto mais contaminado e que o P1 (próximo ao rio Iriri) era o menos contaminado (COIMBRA, M.A.V.; BÍCEGO, M.C., 2006). Porém, os resultados das análises das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* mostraram que muito embora haja diferença entre as estruturas das comunidades dos diferentes pontos amostrados, maiores diferenças ocorrem em função da profundidade nos perfis.

Analisando a riqueza de amplicons de rDNA 16S nota-se que os valores de Sa para *Bacteria* foram maiores na camada de 0-10 cm de P2 (42 bandas) e menores na camada de 20-30 cm de P2 (10 bandas). Ao contrário do domínio *Bacteria*, os maiores valores de Sa para o domínio *Archaea* foram detectados nas amostras mais profundas, sendo que as camadas de 20-30 cm de P3 apresentou 49 bandas. A grande quantidade de bandas detectadas nas amostras

avaliadas sugere uma alta diversidade microbiana, provavelmente devido às elevadas concentrações de carbono. Øvreås e Torsvik (1998), estudando a complexidade de diferentes comunidades microbianas verificaram que a diversidade de bactérias em solos orgânicos é maior do que em solos arenosos sob atividade agrícola, e a possível explicação para as diferenças observadas seria a quantidade de MO no solo. É importante observar neste trabalho que a riqueza de amplicons de *Bacteria* foi menor nas maiores profundidades, ao contrário da riqueza de amplicons de *Archaea*, a qual apresentou menores valores nas camadas mais superficiais. Essas diferenças podem estar relacionadas a baixa capacidade dos microrganismos do domínio *Bacteria* de se adaptarem a ambientes anóxicos, ao contrário dos microrganismos do domínio *Archaea* (ØVREÅS et al., 1993).

A análise comparativa dos resultados obtidos neste trabalho com os de Cury (2002), na mesma transeção do mangue do rio Iriri, mostrou que a organização das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* nos diferentes pontos de amostragem não se alteraram entre os anos 2000 e 2004. Cury (2002) observou em seu trabalho que a estrutura das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* do solo de mangue do rio Iriri eram mais similares entre os pontos amostrados do que entre as profundidades em um mesmo ponto. Resultados similares foram observados neste trabalho, sugerindo que a disponibilidade de carbono, nutrientes e de O₂ podem ser fatores determinantes na estratificação e organização das comunidades microbianas em solos de mangue.

Considerava-se que o domínio *Archaea* era composto por microrganismos que viviam em ambientes extremos em condições anóxicas. No entanto, vários estudos têm demonstrado que as *Archaea* também estão presentes em ambientes não-extremos, incluindo o solo, sedimentos e ecossistemas marinhos (SANDAA; ENGER; TORSVIK, 1999; SEKIGUCHI, 2006; TINDAL, 1992; RÖLING, 2004). O domínio *Archaea* possui quatro filos bem caracterizados: *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota* e *Nanoarchaeota*. O *Crenarchaeota* é o grupo mais restrito, englobando os microrganismos termófilos extremos que metabolizam o enxofre liberado em fontes hidrotermais (SEKIGUCHI, 2006). O filo *Euryarchaeota* é um grupo bastante diversificado filogeneticamente incluindo organismos halofílicos, termófilos e metanogênicos, importantes na degradação de compostos orgânicos (PESARO, WIDMER, 2002; SEKIGUCHI, 2006). Os filos *Korarchaeota* e *Nanoarchaeota* são menos estudados, mas possuem vários simbiontes hipertermófilos (FUGIWARA, 2002). RÖLING et al. (2004), estudando a influência da contaminação de petróleo em sedimentos sob as comunidades de *Archaea*, sugeriu que

microrganismos deste domínio possuem um papel significativo na biodegradação do mesmo, mas que a contaminação tem um efeito negativo nas comunidades de *Archaea* possibilitando que estas possam ser utilizadas como indicadores de impactos ambientais causados por contaminação com petróleo.

O domínio *Bacteria*, atualmente, é composto de 23 filos, determinados com base nas seqüências do rRNA 16S. Alguns destes filos consistem em uma única ou algumas poucas espécies (por exemplo, *Thermomicrobia*, *Chrysiogenetes*, *Fibrobacteres* e *Deferribacteres*), enquanto outros como *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes* incluem milhares de espécies, as quais correspondem a 90-95% de todas as espécies de bactérias conhecidas.

Analisando seqüências de rRNA 16S, Widada et al. (1999) verificaram que vários gêneros de bactérias aquáticas e terrestres (*Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Flavobacterium* e *Bacillus*) estão relacionados a degradação de hidrocarbonetos de petróleo (SANDAA; ENGER; TORSVIK, 1999; AHN et al., 1999; SEKIGUCHI, 2006; RÖLING et al., 2004, SAUL et al., 2005, ABED et al., 2002). Muitos destes microrganismos podem pertencer ao grupo das bactérias sulfato-redutoras (BSR), um grupo extenso e diversificado de microrganismos anaeróbios (DHILLON et al., 2003), os quais podem degradar uma extensa gama de compostos do petróleo, incluindo alcanos (SO; YOUNG, 1999; RUETER et al., 1994), tolueno (BELLER, 1996), benzeno (PHELPS; KERKHOF; YOUNG, 1998) e hidrocarbonetos poliaromáticos (GALUSHKO et al., 1999).

No presente estudo vários grupos de bactérias presente em um solo de mangue do rio Iriri contaminado com petróleo, em amostras coletadas em 2000 e 2004, foram detectados através do seqüenciamento de clones de rDNA 16S.

Acidobacteria e *Nitrospira* foram os únicos dois filos encontrados somente em P2, sendo que o primeiro só foi detectado em amostras coletadas em 2000 e o segundo em 2004. As *Acidobacteria* são amplamente distribuídas em solos e outros habitats (SAIT; DAVIS; JANSSEN, 2006). Este filo é dividido em oito subdivisões (HUGENHOLTZ, 1998), três delas são particularmente abundantes em solos, porém há somente três gêneros formalmente descritos dentro do filo (GARRITY et al., 2004). Todos os isolados deste filo até hoje parecem ser heterotróficos aeróbios, mas isto, no entanto, pode ser resultado das estratégias de cultivo empregadas. Segundo trabalho desenvolvido por Sait, Davis e Janssen (2006), o pH é um fator

importante no crescimento de *Acidobacteria*, as quais apresentam melhor desenvolvimento em condições moderadamente ácidas (pH 5,5-6,5), na presença de CO₂. O filo *Nitrospira* é constituído principalmente de bactérias aeróbias nitrificantes (GU et al., 2004), mas nas amostras de P2(2004) foi detectado o gênero *Magnetobacterium*, um grupo heterogêneo de bactérias aquáticas que possuem a habilidade de se orientar por meio de campos magnéticos. Essas bactérias possuem um alto potencial de acúmulo de minerais férreos precipitados, mas seu papel no ciclo biogeoquímico do Fe é pouco compreendido (FLIES; PEPLIES; SCHÜLER, 2005).

Actinobacteria é um dos principais filos dentro do domínio *Bacteria* (BOONE et al., 2001). Estes organismos são Gram-positivos, geralmente termófilos com um alto conteúdo de G+C (GAO; GUPTA, 2005; CAVALIER-SMITH, 2002). Espécies de *Actinobacteria* são amplamente distribuídas em ecossistemas terrestres e aquáticos (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983; CHUN et al., 2000), e possuem um papel importante na decomposição da matéria orgânica e formação do húmus (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983). O filo *Actinobacteria* inclui 39 famílias e 130 gêneros, fazendo com que este seja um dos maiores grupos do domínio *Bacteria*. Representantes de *Actinobacteria* foram detectados em todas as amostras de solo de mangue. A ordem *Actinobacteridae*, representada pela família *Acidobacteriaceae* foi detectada apenas em P3(2000), enquanto que o gênero *Conexibacter*, da família *Rubrobacteridae*, foi detectado somente em P2(2004). *Conexibacter* são aeróbias heterotróficas de solo envolvidas na redução do nitrato a nitrito (MONCIARDINI et al., 2003).

O filo *Bacteroidetes* foi o segundo mais freqüente nas amostras de solo de mangue analisadas. Membros deste filo são particularmente relevantes em ambientes costeiros (JANSSEN, 2006). A classe *Flavobacteria* é abundante e biologicamente ativa em ambientes marinhos (BRINKMEYER, 2003), possui uma forte associação com algas e são quimioheterotróficas (ABELL; BOWMAN, 2005). Essa classe foi detectada em todos os pontos analisados. A ordem *Flavobacteriales* só não foi encontrada em P1(2000). Nas amostras de P2(2004) as *Flavobacterias* detectadas foram classificadas nos gêneros: *Flavobacterium*, considerado abundante e importante na ciclagem da matéria orgânica de ambientes marinhos (VanTRAPEN et al., 2004); *Gamella*, bactéria marinha, estritamente aeróbica, heterotrófica e Gram-negativa (NEDASHKOVSKAYA et al., 2005), e *Robiginitalea* (família *Flavobacteriaceae*) bactéria marinha com alto teor de G+C e Gram-negativa. A classe *Sphingobacteria*, detectada em P1(2002) e P2(2004), é também comum em ambientes marinhos.

Alguns membros dessa classe são aeróbios, enquanto que outros são anaeróbios ou anaeróbios facultativos, dependendo do nível de oxigênio disponível no ambiente (JANSSEN, 2006). Espécies de *Sphingobacteria* participam da degradação de vários biopolímeros como celulose, quitina, pectina e proteínas (BJORNSDOTTIR et al., 2006).

As bactérias pertencentes ao filo *Chloroflexi*, conhecidas como bactérias verdes não-sufurosas (HUGENHOLTZ; STACKEBRANDT, 2004), são caracterizadas pela capacidade de decompor a matéria orgânica e metabolizar substratos primários, como carboidratos, em ambientes contaminados (YAMADA, 2005). Segundo Wrighton (2005), essas bactérias podem estar associadas com a atenuação natural de petróleo. Este filo foi encontrado em todos os pontos analisados neste estudo. O gênero *Anaerolinea* (*Anaerolineales*, *Anaerolineaceae*), detectado em P1(2000), P3(2000) e P2(2004), é constituído de bactérias anaeróbias, heterotróficas e termofílicas (JANSSEN, 2006).

Recentemente, Godon et al. (2005) avaliaram a ocorrência do filo *Deferribacteres* e verificaram sua presença em 93 ecossistemas anaeróbios (solo de floresta, solo de floresta contaminado com Hg, solo de mangue, solo de mangue contaminado com resíduos de destilaria, solo degradado após extração de ouro, solo cultivado com cana de açúcar, rochas vulcânicas e intestino de metazoários), e verificou que esse filo é constituído de anaeróbios estritos, sugerindo que essas bactérias possuem um papel importante na degradação de aminoácidos em condições anaróbias. Representantes desse filo foram encontrados em todas as camadas de solos de mangue do rio Iriri estudadas. No ponto P2, nas amostras coletadas em 2000 e 2004, foram detectadas bactérias do gênero *Caldithrix*, bactéria anaeróbia termofílica com função nitrato-redutora (MIROSHNICHENKO et al., 2003).

O filo *Firmicute*, composto por bactérias aeróbias e anaeróbias Gram-positivas, foi detectado em todos os pontos da transeção do mangue do rio Iriri analisados neste estudo. Bactérias pertencentes a este filo têm grande importância no ciclo do enxofre (JANSSEN, 2006). Representantes do gênero *Bacillus* (classe *Bacilli*), considerados termófilos, aeróbios e halofílicos, foram detectados somente em P2(2004). Alguns estudos mostram que várias espécies de *Bacillus* são capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo, utilizando carbono como fonte energética (SORKHOH et al., 1993). Da classe *Clostridia* dois gêneros foram detectados no solo de mangue do rio Iriri: *Clostridium* (*Clostridiales*, *Clostridiaceae*) presente em P2(2004) e *Fusibacter* (*Fusobacteria*, *Fusobacteriales*) presente em P1(2000). As bactérias do gênero

Clostridium crescem em temperaturas altas a moderadas e participam do ciclo do nitrogênio convertendo nitrogênio orgânico em amônia (BHAT; VERLECAR, 2006).

O filo *Gemmatimonadetes*, detectado em P3(2000) e P2(2004), ocorre em diversos ambientes, como lodos industriais e sedimentos marinhos. Somente uma espécie de *Gemmatimonadetes* foi isolada até o presente (*Gemmatimonas aurantiaca*, bactéria Gram-negativa, aeróbia e mesofílica) (JANSSEN, 2006; ZHANG et al., 2003).

Uma das maiores filos do domínio *Bacteria* é *Proteobacteria*. Atualmente esse filo contém aproximadamente 528 gêneros descritos (GARRITY et al., 2004), mas o número de seqüências de rDNA 16S relacionadas à *Proteobacteria* que podem ser confiantemente classificadas em gêneros conhecidos é relativamente baixo indicando a existência de um grande número de protobactérias ainda não isoladas. Dado a extensão da diversidade fisiológica dentro do filo, a determinação de seus papéis em solos de mangue é complexa (JANSSEN, 2006). *Proteobacterias* são comuns em ambientes marinhos (SEKIGUCHI et al., 2002; WAGNER-DÖBLER et al., 2002), e podem apresentar metabolismo autotrófico ou heterotrófico, aeróbio ou anaeróbio (MARGULIS; SCHWARTZ, 1998). Em ambientes marinhos estão sempre associadas às plantas, animais ou materiais particulados (MADRID et al., 2001; WEIDNER et al., 2000; LAU et al., 2002). Também são eficientes na degradação de hidrocarbonetos, incluindo componentes aromáticos, halifáticos e estruturas moleculares (ATLAS, 1981). Hayes e Lovely (2002) sugeriram que algumas proteobactérias possuem função sulfato- redutoras, podendo ter, portanto, importante papel na ciclagem de S em solos de mangue.

Dentre todos os filos de bactérias presentes no solo de mangue do rio Iriri, *Proteobacteria* foi o filo mais abundante, representando em média 70% das seqüências de rDNA 16S avaliadas (variando de 17 a 75%). Neste filo representantes das 5 classes foram detectados: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* e *Deltaproteobacteria* (Figura 5B), sendo *Gammaproteobacteria* a classe mais abundante e com maior diversidade.

Dentre os membros pertencentes à classe *Alphaproteobacteria* são encontradas bactérias de vida livre associadas ao ambiente marinho (KIRCHMAN, 2000). Bactérias marinhas são principalmente distribuídas nas ordens *Rhodobacterales*, *Sphingomonadales* e *Caulobacterales* (GIOVANNONI; RAPPE, 2000) e a maioria delas possuem um papel importante de degradação hidrocarbonetos do petróleo (HEDLUND et al., 1999). *Rhodobacterales* foram detectadas em

P1(2000), P3(2000) e P2(2004) e são consideradas bactérias anóxicas fotossintéticas comuns em solos de mangues (BASHAN; HOLGUIN, 2001). A ordem *Rhizobiales*, presente em todos os pontos, foi a que apresentou maior número de gêneros representados nas amostras de solo de mangue do rio Iriri. O gênero *Mesorhizobium* (família *Phyllobacteriaceae*), presente em P1(2000), exibe baixa tolerância à salinidade e forma nódulos fixadores de nitrogênio em raízes de leguminosas (KÄMPFER et al., 1999; YOUNG et al., 2001). Bactérias do gênero *Hyphomicrobium*, detectadas somente em P2(2004), estão relacionados à oxidação de manganês e ferro (NORTHUP, 2003). O gênero *Rhodobacter*, composto por bactérias marinhas halofílicas são ainda pobremente caracterizadas (ABELL, 2005).

A classe *Betaproteobacteria* também foi detectada em todas as amostras de solo do mangue do rio Iriri. Sequências de rDNA 16S detectadas em P2 (2004) foram classificadas em duas ordens: *Rhodocyclales*, envolvida na degradação de nafetaleno (HEDLUND, 1999); e *Burkholderiales*, envolvida na degradação de compostos naturais, hidrocarbonetos e xenobióticos encontrados em lodo de esgoto, solos e águas residuárias (WILLEMS et al., 1992).

A classe *Deltaproteobacteria* inclui bactérias mesofílicas redutoras de sulfato. Os gêneros *Desulfonema* e *Desulfosarcina* (*Desulfobacterales*, *Desulfobacteraceae*) foram detectados em P1(2000) e P2 (2004), e podem estar envolvidas na redução do sulfato nesse ambiente. *Desulfovirga* (*Syntrophobacterales*, *Syntrophobacteraceae*) foi detectada em P1(2000), e pode estar também envolvida na redução de sulfato (WEBSTER et al., 2006; MANABU et al., 1999). Segundo Mußmann (2005), as *Desulfosarcinas* (*Desulfobacterales*, *Desulfobacteraceae*) são dominantes em ambientes contaminados com petróleo, participando de sua degradação.

A classe *Epsilonproteobacteria*, presente em todas as amostras de solo de mangue do rio Iriri, é o grupo mais recentemente definido, possuindo apenas uma ordem (*Campylobacterales*) e duas famílias: a *Campylobacteraceae* e a *Helicobacteraceae*. A primeira foi detectada em P2(2000) e P3(2000) e a segunda em P1(2000), P3(2000) e P2(2004). Os gêneros *Sulfurovum* detectados em P1 e P3 coletadas em 2000 e *Sulfurimonas* detectados em P2(2004) são bactérias oxidantes de enxofre encontradas em ambientes hidrotermais (INAGAKI et al., 2004).

A classe de bactérias mais abundante no solo de mangue do rio Iriri foi *Gammaproteobacteria*, representando aproximadamente 28% dos clones de rDNA 16S avaliados. As *Gammaproteobacteria* detectadas foram classificadas em nove ordens, sendo que somente a *Chromatiales* foi observada em todos os pontos analisados. Desta ordem, a qual engloba as

bactérias fototróficas púrpuras de enxofre e que participa da oxidação de sulfetos e tiosulfetos (GORLENKO et al., 2004), foram detectados três gêneros: *Thiohalocapsa* em P2(2000), *Thiomicrospira* em P1(2000) e *Thioalkalispira* em P2(2000), P3(2000) e P2(2004). As ordens *Enterobacteriales* e *Methylococcales*, representadas pelos gêneros *Enterobacter* e *Methylobacter*, respectivamente foram detectadas somente em P2(2004). O gênero *Methylobacter* possui um importante papel na degradação de metano, gás produzido pelos microrganismos metanogênicos (BOWMAN, 1993). Da ordem *Oceanopirillale*, conhecida por realizar a degradação aeróbia heterotrófica de compostos orgânicos complexos (GOFFREDI et al., 2005), foram detectados representantes do gênero *Marinomonas*, bactérias obrigatoriamente marinhas caracterizadas pela versatilidade nutricional, e alto potencial para degradação hidrocarbonetos alifáticos (YAKIMOV et al., 2004). Bactérias marinhas com alto teor de G+C da ordem *Alteromonadales* (ROMANENKO et al., 2003) foram detectadas em todos os pontos do mangue do rio Iriri.

Em P3(2000) foi detectada a presença de *Pseudomonas plecoglossicida*, a qual pode ter um importante papel na degradação de hidrocarbonetos do petróleo. Estudos realizados por Sondf (2003) mostraram que esta espécie produz íons cloretos em condições aeróbias à partir de hidrocarbonetos haloalifáticos, por meio de cloração hidrolítica. Segundo Cerniglia (1993), a maioria das bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo pertencem ao gênero das *Pseudomonas*, sendo que o gene relacionado à degradação de hidrocarbonetos é altamente homólogo ao gene responsável pela degradação do naftaleno (*nah*). As bactérias da ordem *Vibrionales*, que também podem estar envolvidas na degradação de hidrocarbonetos, foram detectadas em P2(2000) e P3(2000). Essas bactérias são aeróbias heterotróficas, moderadamente halofílicas e podem ser encontradas em ambientes costeiros estuarinos e águas doces de climas tropicais (NAIR et al., 1985; SARKAR et al., 1983).

A análise das seqüências de clones de rDNA 16S de *Bacteria* dos diferentes pontos amostrados em abril de 2000, através do índice de Shannon, mostrou que a diversidade genética das comunidades microbianas diferem estatisticamente somente entre ponto o P1 (ponto menos contaminado) e P3 (ponto mais contaminado). Considerando-se uma distância evolutiva (D) de 0,01 ou 0,03 para definição de UTOs, observou-se que as estimativas de riqueza de UTOs nas amostras coletadas em 2000 foram mais elevados para os pontos P1 e P2 do que para P3. Nos pontos P1, P2 e P3 o número estimado de espécies de bactérias, considerando-se D=0,03, foi de 3539, 2524, 1421 respectivamente. No entanto, como os índices de cobertura das bibliotecas de

rDNA16S analisadas é baixo, a diversidade de espécies bacterianas no solo de mangue do rio Iriri pode estar subestimada.

Os índices de diversidade mostraram que muito embora os valores dos índices de Shannon em amostras de P2 coletados em 2000 e 2004 tenham sido semelhantes, houve uma provável dominância de grupos específicos em P2(2004), verificado pelos altos valores expressos pela recíproca do índice de Simpson, o qual foi cinco vezes maior que em P2(2000). O S-libshuff também comprovou este resultado mostrando que as comunidades bacterianas em amostras de P2 coletadas em 2000 e 2004 são estatisticamente diferentes. Este fato sugere que a contaminação de hidrocarbonetos no manguezal do rio Iriri está influenciando selecionando microrganismos mais adaptados à essa fonte de carbono.

3. CONCLUSÕES

As estruturas das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* nos solos de mangue do rio Iriri foram mais similares entre os pontos amostrados do que entre as diferentes profundidades em um mesmo ponto.

A riqueza de amplicons de *Bacteria* foi maior nas amostras das camadas superficiais, ao contrário do que foi observado para *Archaea*, que apresentou maior riqueza de amplicons nas amostras das camadas mais profundas.

Vários grupos taxonômicos de *Bacteria* detectados nos solos de mangue estão diretamente relacionados com os processos biogeoquímicos típicos do ambiente.

Houve redução da riqueza estimada de espécies de bactérias no ponto P2 ao longo de 4 desde a primeira amostragem.

A redução da riqueza estimada de espécies de bactéria no solo de mangue pode estar associada à presença de petróleo remanescente do derramamento ocorrido em 1983.

REFERÊNCIAS

- ABED, R. M. M; SAFI, N.M.D.; KÖSTER, J.; BEER, D.; EL NAHHAL, Y; RULLKÖTTER, J.; GARCIA-PICHEL, F. Microbial Diversity of a Heavily Polluted Microbial Mat and Its Community Changes following Degradation of Petroleum Compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1674–1683, 2002.
- ABELL, G.C.J.; BOWMAN, J. P. Ecological and biogeographic relationships of class Flavobacteria in the Southern Ocean. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 51, p. 265–277, 2005.
- ABELL., G.C.J. *Flavobacteria* in the southern ocean. B.AppSc. 2005. p.170 B.Sc (Hons) (Thesis Ph.D.) - Philosophy Department of Agricultural Science University of Tasmania, 2005.
- AHN, Y.; SANSEVERINO, J.; SAYLER, G.S. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from contaminated soils. **Biodegradation**, Wageningen, v. 10, p. 149–157, 1999.
- AKSORNKOAE, S.; ARROYO, C.; BLASCO, F.; BURBRIDGE, P.R.; TUCK, C.H.; CINTRON, G.; DAVIE, J.D.S.; DIXON, J.A.; HAMILTON, L.S.; HEALD, E.; HEGERL, E.; LAL, P.; LUNA LUGO, A.; PANNIER, F.; RAMDIAL, B.; SAENGER, P.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; SCHWEITHELM, J.; SNEDAKER, S.C.; SRIVASTAVA, P.D.L.; WEIDENBACH, R.; YOKEL, B.; DIXON, R.G.; EONG, O.J.; SAIFULLAH, S.M. **Handbook for mangrove area management**: Honolulu: United Nations Environment Program and East-West Center, Environment and Policy Institute, 1984. p 122.
- ARMANN, R.I.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA- targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **Microbiology Reviews**, New York, v. 24, p. 555-565, 2000.
- ATLAS, M.R. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, Amsterdam, v. 45, n. 1, p. 180-209, 1981.
- BAMFORTH, S.M.; SINGLETON, L. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Hoboken, v. 80, p. 723–736, 2005.
- BARTHA, R.; ATLAS, R.M. The microbiology of aquatic oil spills. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v.22, p. 225-226, 1977.
- BASHAN Y.; ·HOLGUIN, G. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. **Trees**, Berlin, v. 16, p. 159–166, 2002.
- BELLER, H. R.; SPORMANN, A. M.; SHARMA, P. K.; COLE, J. R.; REINHARD. M. Isolation and characterization of a novel toluene-degrading sulfatereducing bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 1188–1196, 1996.

BHAT, S. R.; VERLECAR, X. N. Some enigmatic aspects of the marine cyanobacterial genus, *Trichodesmium*. **Current Science**, Bangalore, v. 91, n. 1, 2006.

BILLERBECK, M. **Pore water transport and microbial activity in intertidal Wadden Sea sediments**. 2005. 188p. (Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften dem Fachbereich Biologie/Chemie) - Universität Bremen, Bremen, 2005.

BJORNDOTTIR, S.H.; BLONDAL, T.; HREGGVIDDSSON, G.O.; EGGERTSSON G.; PETURSDOTTIR, S.; HJORLEIFSDOTTIR, S.; THORBJARNARDOTTIR, S.H.; KRISTJANSSON, J.K. *Rhodothermus marinus*: physiology and molecular biology. **Extremophiles**, Tokyo, v.10, p. 1-16, 2006.

BOHANNAN, B.J.M.; HUGHES J. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, p. 282–287, 2003.

BOND, P.L., HUGENHOLTZ, P., KELLER, J., BLACKALL, L.L. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphateremoving activated sludges from sequencing batch reactors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1910–1916, 1995.

BOON, N.; MARLÉ, C.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, W. Comparison of the spatial homogeneity of physico- chemical parameters and bacterial 16S rDNA genes in sediment samples from a dumping site for dredging sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 53, p. 742-747, 2000.

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. **Bergey's manual of systematic bacteriology** 2nd ed. New York: Springer, 2001. vol. 1.

BOWMAN, J.P.; SLY, L.I.; NICHOLS, P.D.; HAYWARD, A.C. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 43, p. 735-753, 1993.

BREEMEN, N.V.; BUURMAN, P. **Soil formation**. Dordrecht: Kluwer, 1998. 376p.

BRINKMEYER, R.; KNITTEL, K.; JURGENS, J.; WEYLAND, H.; AMANN, R.; HELMKE, E. Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 6610–6619, 2003.

CANTARELLA, H.; QUAGGIO, A.J.; van RAIJ, B. Determinação da matéria orgânica. In: .; van RAIJ, B; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H; QUAGGIO, A.J.. (Ed.). **Análise química para avaliação de fertilidade de solos tropicais**. Instituto Agrônomo de Campinas, 2002. p. 173-180.

CAVALIER-SMITH, T. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v.1, p. 52, 7–76, 2002.

CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology**, New York, v. 4, p. 331–338, 1993.

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

CHAO, A.; LEE, S. M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of the American Statistical Association**, Alexandria, v. 87, p. 210–217. 1992.

CHAO, A.; SHEN, T.J.; HWANG, W. Application of laplace's boundary-mode approximations to estimate species and shared species richness. **Australian & New Zealand Journal of Statistics**, Melbourne, v. 48, n. 2, p. 117–128, 2006.

CHO, J.C.; GIOVANNONI, S.J. *Robiginitalea biformata* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium in the family *Flavobacteriaceae* with a higher G+C content. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 1101-1106, 2004.

CHUN, J.; BAE, K.S.; MOON, E. Y.; JUNG, S. O.; LEE, H. K.; KIM, S. J. *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 50, p. 1909–1913, 2000.

CINTRÓN, G; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Introducción a la ecología del manglar**. Montevideo: Oficina Regional de Ciencia y Tecnología de la Unesco para América Latina y el Caribe, 1983. 109p.

COIMBRA, M.A.V.; BÍCEGO, M.C. **Avaliação dos resultados analíticos de hidrocarbonetos como instrumento jurídico em caso de derrames de petróleo: mangue de Bertioğa**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química) –Universidade de São Paulo – Instituto Oceanográfico, São Paulo, 2006.(Noprelo).

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

DHILLON, A.; TESKE, A.; DILLON, J.; STAHL,D.A.; SOGIN, M.L. Molecular Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria in the Guaymas Basin **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n.5, p. 2765–2772, 2003.

DIEGUES, A.C.S. **Ecologia humana e planejamento em áreas costeiras**. 2ed. São Paulo: USP, Núcleo de Apoio à Pesquisa sobre Populações Humanas em Áreas Úmidas Brasileiras, 2001. 225p.

EL-TARABILY, K.A. Total microbial activity and microbial composition of a mangrove sediment are reduced by oil pollution at a site in the Arabian Gulf. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 176–182, 2002.

EMBLEY, T. M.; STACKEBRANDT, E. Species in practice: exploring uncultured prokaryote diversity in natural samples. In: CLARIDGE, M. F.; DAWAH, H. A.; WILSON, M. R. (Ed.). *Species: the units of biodiversity*. Chapman and Hall, London, 1997. p. 61–81.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

FERREIRA, T.O. **Solos de mangue do rio Cumahú (Guarujá – SP):** pedologia e contaminação o esgoto domestico. 2002.113p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

FIERER L., N; JACKSON, J.A.; VILGALYS,R; JACKSON, R.B. Assessment of soil microbial community structure by use of táxon – specific quantitative PCR assays. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 4117-4120, 2005.

FIRME, L.P. **Caracterização físico-química de solos de mangue e avaliação de sua contaminação por esgoto doméstico via traçadores fecais.** 2003. 70p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

FLIES C.B; PEPLIES, J.; SCHU“LER, D. Combined approach for characterization of uncultivated magnetotactic Bacteria from Various Aquatic Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 2723–2731, 2005.

FUHRMAN, J.A.; McCALLUM, K.; DAVIS, A.A. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. **Nature**, London, v. 356, p. 148-149, 1992

FUHRMAN, J.A.; A.A. DAVIS. Widespread *Archaea* and novel microbial *Bacteria* from the deep sea as shown by 16S rRNA gene sequences. **Marine Ecology Progress Series**, Germany, v. 150, p. 275–285, 1997.

FUJIWARA, S. Extremophiles: developments of their special functions and potencial resources. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 94, p. 518-525, 2002.

FUKUI, M.; TESKE, A.; ABMUS, B.; MUYZER, G.; WIDDEL, F. Physiology, phylogenetic relationships, and ecology of filamentous sulfate-reducing bacteria (genus *Desulfonema*). **Archives of Microbiology**, New York, v. 172, p. 193–203, 1999.

GALUSHKO, A.; MINZ, D.; SCHINK, B.; WIDDEL, D F. Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type marine sulfatereducing bacterium. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 415–420, 1999.

GAMERO, R.M.P. **Mineralogia, físico-química e classificação dos solos de mangue do Rio Iiri do canal de Bertioga (Santos-SP)**. 2001. 76p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

GAO, B.; GUPTA, R.S. Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 55, p. 2401–2412, 2005.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. **Taxonomic outline of the Prokaryotes. Bergey’s manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. Release 5.0. New York: Springer, 2004. <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline>.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.H. A road map to the manual. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, G.M.; GARRITY (Ed.). **Bergey’s manual of systematic bacteriology**. 2nd ed., Berlin: Springer-Verlag, 2001. p. 119-166.

GASTON, K. J. Species richness: measure and measurement. In: GASTON, K. J. (Ed.), **Biodiversity: a biology of numbers and difference**. Blackwell, Cambridge, England, 1996. p. 77–113.

GIOVANNONI, S.J.; RAPPÉ, M.S. Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. In: KIRCHMAN, D.L. (Ed.). **Microbial ecology of the oceans**. New York: Wiley-Liss, 2000. p. 47-84.

GIRVAN, M. S.; CAMPBELL, C. D.; KILLHAM, K.; PROSSER, J. I.; GLOVER, L. A. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 301–313, 2005.

GODON, J.J.; MORINIERE, J.; MOLETA M.; GAILLAC, M.; BRU, V.; DELGENESJ, P. Rarity with specific ecological niches in the bacterial world: ‘Synergist’ example. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.7, p. 2131- 2224, 2005.

GOFFREDI, S. K.; ORPHAN, V. J.; ROUSE, G.W.; JAHNKE, L.; EMBAYE, T.; TURK, K.; LEE, R.; VRIJENHOEK, R.C. Evolutionary innovation: a bone-eating marine symbiosis. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 1369–1378, 2005.

GOOD, I. J. The population frequency of species and the estimation of population parameters. **Biometrika**, Oxford, v. 40, n. 237–264, 1953.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 37, p. 189–216, 1983.

GORLENKO, V.M. BRYANTSEVA, I.A.; PANTELEEVA, E.E.; TOUROVA, T.P. KOLGANOVA, T.V.; MAKHNEVA, Z.K.; MOSKALENKO, A.A. *Ectothiorhodosinus*

GROUDIEVA, T.; KAMBOUROVA, M.; YUSEF, H.; ROYTER, M.; GROTE, R.; TRINKS, H.; GARABED, A. Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen. **Extremophiles**, New York, v. 8, p. 475–488, 2004.

GU, A. Z.; HEDLUND, B. P.; STALEY, J. T.; STRAND, S. E.; STENSEL, H. D. Analysis and comparison of the microbial community structures of two enrichment cultures capable of reductively dechlorinating TCE and *cis*-DCE. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n.1, p. 45–54, 2004.

GUPTA, R.S. Protein Phylogenies and Signature Sequences: A Reappraisal of Evolutionary Relationships among Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 4, p. 1435–1491, 1998.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and sustainable agriculture. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 641–655, 1991.

HAYES, L.A., LOVELY, D.R. Specific 16S rDNA sequences associated with naphthalene degradation under sulfate-reducing conditions in harbor sediments. **Microbial Ecology**, New York, v. 43, p. 134–145, 2002.

HEDLUND, B.P.; GEISELBRECHT, A.D.; BAIR, T. J.; STALEY, J. T. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by a New Marine Bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 1, p. 251–259, 1999.

HEWSON, I.; FUHRMAN, J.A.. Improved strategy for comparing microbial assemblage fingerprints. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, p. 147–153, 2006.

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

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 4765–4774. 1998.

INAGAKI, F.; TAKAI, K.; NEALSON, K. H.; HORIKOSHI, K. *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the e-Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 1477–1482, 2004.

JOYNT, J.; BISCHOFF, M.; TURCO, R.; KONOPKA, A.; NAKATSU, C.H. Microbial Community Analysis of Soils Contaminated with Lead, Chromium and Petroleum Hydrocarbons. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, p. 209–219, 2006.

KAMPFER, P.; MULLER, C.; MAU, M.; NEEF, A.; AULING, G.; BUSSE, H.-J.; OSBORN, A. M.; STOLZ, A. Description of *Pseudaminobacter* gen. nov. with two new species,

Pseudaminobacter salicylatoxidans sp. nov. and *Pseudaminobacter defluvii* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v. 49, p. 887–897, 1999.

KEMP, P.F.; ALLER, J.Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us, **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford v. 47, p. 161–177, 2004.

KENNEDY, A.C.; SMITH K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.170, n.1, p.75–86, 1995.

KUZNETNOV, V. D.; ZAITSEVA, T. A.; VAKULENKO, L. V.; FILIPPOVA, S. N. *Streptomyces albiacialis* Sp. nov. – a new petroleum hydrocarbon-degrading species of thermo- and halotolerant *Streptomyces*. **Mykrobiologiya**, Oklahoma, v. 61, p. 84–91, 1992.

LACERDA, L.D. Manguezais: florestas de beira mar. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 13, p. 62–70, 1984.

LACERDA, L.D.; CONDE, J.E.; ALARCÓN, C.; ALVAREZ-LEON, R.; BACON, P.R.; D'CROZ, L.D.; KJERFVE, B.; POLANIA, J.; VANNUCCI, M. Ecosistemas de manglar de America Latina y el Caribe: Sinopsis. In: LACERDA, L.D.; POLANIA, J. (Ed) **Conservacion y aprovechamiento sostenible de bosques de manglar en las regiones America Latina y Africa** Okinawa: International Tropical Timber Organization and International Society for Mangrove Ecosystems, p. 1–38, 1993.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos Paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L. R. F.; COOPER, M.; SILVA, A. P.; CARDOSO, E. J.. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 43–84.

LAMBERTI, A. **Contribuição ao conhecimento da ecologia das plantas do manguezal de Itanhaém**. 1966. 217p. Tese (Doutorado em Ciência) – Faculdade de Filosofia de Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1966.

LaMONTAGNE, M. G.; LEIFER, I.; BERGMANN, S; Van De WERFHORST, L. C.; HOLDEN, P. A. Bacterial diversity in marine hydrocarbon seep sediments. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 8, p.799–808, 2004.

LAMPARELLI, C.C. **Mapeamento dos ecossistemas costeiros do estado de São Paulo**. São Paulo: Cetesb, 1998. 108p.

LAMPARELLI, C.C.; MOURA, D.O.; RODRIGUES, F.O.; VICENT, R.C. B. **Padrões ambientais dos manguezais de Bertioga (São Paulo-Brasil):** subsídios para avaliação de impactos. Relatório Anual. São Paulo, CETESB, 77p, 1997.

LANI, J.L. **Deltas dos rios Doce Itapemirim: solo, com ênfase tiomórficos, águas e impacto ambiental do uso**. 1998. 169p. Tese (Doutorado em solos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

LIU, D.; MAGUIRE, R.J.; PACEPAVICIUS, G.J.; NAGY, E. Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Polycyclic Aromatic Nitrogen Heterocyclics. **Environmental Toxicology and Water Quality**, Ontario, v.7, n. 4, p. 355-372, 1992.

LLOBET-BROSSA E.; ROSSELLO-MORA R.; AMANN R. Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 64, p. 2691- 2696, 1998.

LOKABHARATHI, P.A. **synergy in sulfur cycle**: the biogeochemical significance of sulfate reducing bacteria in syntrophic associations marine microbiology: facets & opportunities. Ramaiah, p. 27-35, 2005.

LOZUPONE C.; KNIGHT, R. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 8228–8235, 2005.

MACKIN, L.E.; SWIDER, K.T. Organic matter decomposition pathway and oxygen consumption in coastal marine sediments. **Journal of Marine Research**, New Haven, v.47, p. 681-716, 1989.

MADRID, V. M.; ALLER, J. Y.; ALLER, R.C.; CHISTOSERDOV, A.Y. High prokaryote diversity and analysis of community structure in mobile mud deposits of French Guiana: identification of two new bacterial candidate divisions. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 37, p. 197-209, 2001.

MARGALEF, R. Information theory in ecology. **Genetic Systematic**, New York. v. 3, p. 36–71. 1958.

MARTINY, J.B.H.; BOHANNAN, B.J.M; BROWN, J.H.; COLWELL, R.K.; FUHRMAN, J.A.; GREEN, J.L.; HORNER-DEVINE, M.C.; KANE, M.; KRUMINS, J.A.; KUSKE, C.R.; MORIN, P.J.; NAEEM, S.; ØVREÅS, L.; REYSENBACH, A.; SMITH, V.H.; STALEY, T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature**, London, v. 4, p. 102-112, 2006.

MCLAUGHLIN, A.; MINEAU, P. The impact of agricultural practice on biodiversity. **Agriculture, Ecosystem & Environmental**, New York, v.55, p. 201–212, 1995.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa, CNPMA, 1998, p.308-314. **Microbiology**, New York, v. 73, p. 66-73, 2004.

MILLE, G.; GUILIANO, M.; ASIA, L.; MALLERET, L; JALALUDDIN, N. Sources of hydrocarbons in sediments of the Bay of Fort de France (Martinique) **Chemosphere**, Atlanta, v. 64, p. 1062–1073, 2006.

MIROSHNICHENKO, M. L.; KOSTRIKINA, N.A.; CHERNYH, N. A.; PIMENOV, N. V.; TOUROVA, T.P.; ANTIPOV, A.N.; SPRING, S.; STACKEBRANDT, E.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E.A. *Caldithrix abyssi* gen. nov., sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic, anaerobic bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 53, p. 323–329, 2003.

MONCIARDINI, P.; CAVALETTI, L.; SCHUMANN, P.; ROHDE, M.; DONADIO, S. *Conexibacter woesei* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class Actinobacteria Germany. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 53, p. 569–576, 2003.

MOREIRA, F.M.S; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo** 2nd ed. Lavras: UFLA, 2005. 233p.

MORENO, C.M.; BECERRA, A.G.; SANTOS, M.J.B. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v. 21, p. 103-120, 2004.

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

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 73, p. 127–141, 1998.

NAIR, G.B.; SARKAR, B.L.; ABRAHAM, M. T.; PAL, S.C. Serotypes of vibrio parahaemolyticus isolates from hydrobiologically dissimilar aquatic environments, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 50, p. 724-726, 1985.

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

NEDASHKOVSKAYA, O.I.; KIM, S.B.; LEE, D.H.; LYSSENKO, A.M.; SHEVCHENKO, L.S.; FROLOVA, G.M.; MIKHAILOV, V.V.; LEE, K.H.; BAE, K.S. *Roseivirga ehrenbergii* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the phylum ‘Bacteroidetes’, isolated from the green alga *Ulva fenestrata*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 55, p. 231-234, 2005.

NICHOLSON, C.A.; FATHEPURE, B.Z. Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 1222–1225, 2004.

NOGUEZ, A.M.; ARITA, H.T.; ESCALANTE, A.E.; FORNEY, L.J.; GARCÍA-OLIVA, J; SOUZA, V. Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest. **Global Ecology Biogeography**, Oxford, v. 14, p. 241–248, 2005.

NORTHUP, D.E.; BARNES, S.M.; YU, L.E.; SPILDE, M.N.; SCHELBLE, R.T.; DANO, K.E.; CROSSEY, L.J.; CONNOLLY, C.A.; BOSTON, P.J.; NATVIG, D.O.; DAHM, C.N. Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechuguilla and Spider Caves **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 11, p. 1071–1086, 2003.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; KÜHL, M.; MUYZER, G. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 422–43, 1999.

NYMAN J.A. Effect of crude oil and chemical additives on metabolic activity of mixed microbial populations in fresh marsh soils. **Microbial Ecology**, New York, v. 37, p. 152–162, 1999.

ODUM, E.P **Ecologia** 3.ed. México, Nueva Editorial Interamericana, 1972. 639 p.

ØVREÅS, L. Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters**, London, v. 3, p. 236–251, 2000.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of per-amplified gene fragments coding for 16s rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 9, p. 3367–3373, 1997.

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

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

PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE D. J.; OLSEN, G. J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 9, p. 1–55, 1986.

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

PHELPS, C.; KERKHOF, L. J.; YOUNG, L. Y. Molecular characterization of a sulfate reducing consortium that mineralizes benzene. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 27, p. 269–279. 1998.

PONTE, A.C.E; FONSECA, I.A.Z; MARQUES, M.; FREITAS, M.L.; CLARO, S.M.C.A. Impacto causado por petróleo no manguezal do Canal de Bertioga. In: SIMPÓSIO SOBRE ECOSSISTEMA DA COSTA SUL E SUDOESTE BRASILEIRA, 1., 1987, Cananéia. **Anais...**São Paulo: ACIESP. p. 138–47, 1987.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Rodrigues, 2001. 328p.

RODRIGUES, F.O.; MOURA, D.O; LAMPARELLI, C.C. **Avaliação dos efeitos de uma derramamento de óleo em áreas de manguezais (Bertioga-SP)**. São Paulo: CETESB, 1989.118p,

RODRIGUES, F.O.; MOURA, D.O; LAMPARELLI, C.C. Efeito do óleo em folhas de mangues. **Revista Ambiente**, Campinas, p. 36-45, 1989.

RODRIGUES, F.O.; MOURA, D.O; LAMPARELLI, C.C. evolução das alterações estruturais e funcionais provocadas por óleo no manguezal do Rio Iri. In: SIMPÓSIO SOBRE ECOSSISTEMAS DA COSTA SUL E SUDOESTE BRASILEIRA, 2., 1990, Águas de Lindóia. **Anais...** São Paulo: ACIESP, 1990. p. 194-208,.

RÖLING, W.F.M.; BRITO, I.R.C; SWANNELL, R.P.J.; HAED, M.I. Response of community in beach sediments off spilled oil bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 2614-2620, 2004.

ROMANENKO, L.A.; UCHINO, M.; MIKHAILOV, V.V.; ZHUKOVA, N. V.; UCHIMURA, T. *Marinomonas primoryensis* sp. nov., a novel psychrophile isolated from coastal sea-ice in the Sea of Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 53, p. 829–832, 2003.

ROSSI, M.; MATTOS, I.F. O ecossistema de mangue. Uma análise dos solos e da vegetação de São Paulo. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS: Conservação da biodiversidade, 2., São Paulo, 1992. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal, 1992. p. 930-932.

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.

RUETER, P.; RABUS, R.; WILKES, H.; AECKERSBERG, F.; RAINEY, F. A.; W. JANNASCH, H.; WIDDEL, F. Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulfite reducing bacteria. **Nature**, London, v. 372, p. 455–458, 1994.

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

SANT'ANNA, E.M. & WHATELY, M.H. Distribuição dos manguezais do Brasil. **Revista Brasileira de Geografia**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 47-63, 1981.

SCHAEFFER- NOVELLI, Y.; JUNIOR, C.C.; TOGNELA-DE-ROSA, M. **Manguezais**. São Paulo: Ática, 2001, 48p.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Avaliações e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha** USP São Paulo: USP, Instituto Oceanográfico, 1999, 56p.

SCHAEFFER, P.; MILLE, G. Biodegradation of crude oil in a experimentally polluted peaty magrove soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.8, p.3293-3297, 1989.

SCHLOSS, P.D.; LARGET, B.R.; HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v, 70, n.9, p. 5485–5492 , 2004.

SCHULZ, H.D. Redox measurements in marine sediments. In: SCÜRING, J.; SHULZ, H.D; FISCHER, W.R.; BÖTTCHER, J; DUIJNISVELD, W.H.M. (Ed.) **Redox: fundamentals processes and applications**. Berlin: Springer, 2000. cap. 19, p. 235- 246.

SEKIGUCHI, H. yet-to-be cultured microorganisms relevant to methne fermentation process. **Microbes and Environments**, Kyoto, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2006.

SEKIGUCHI, H.; KOSHIKAWA, H.; HIROKI, M.; MURAKAMI, S.; XU, K.; WATANABE, M.; NAKAHARA, T.; ZHU, M.; UCHIYAMA, H. Bacterial distribution and phylogenetic diversity in the Changjiang estuary before the construction of the three gorges dam. **Microbial Ecology**, New York, v. 43, p. 82– 91, 2002.

SHANNON, C.E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communicaton**. Illinois: University of Illinois Press, 1949.

SHEN T.J.; CHAO, A.; LIN, C.F. Predicting the number of new species in further taxonomic sampling. **Ecology**, Ithaca, v. 84, n. 3, p. 798–804, 2003.

SIMPSON, E. H. Measurement of Diversity. **Nature**, London, v. 163, p. 688, 1949.

SINGH, B.K.; MUNRO, S.; E. REID, E.; ORD, B.; POTTS, M.J.; PATERSON, E.; MILLARD, P. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 57, p. 72– 82, 2006.

SINGLETON, D. R., M. A. FURLONG, S. L. RATHBUN, AND W. B. WHITMAN. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p.4374–4376, 2001.

SPARLING, G.P. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. **Australian Journal of Soil Research**, Collingwood, v. 30, p. 195-207, 1992.

SO, C. M.; YOUNG, L. Y. Isolation and characterization of a sulfatereducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2969–2976.

SONG, JI-SOOK.; LEE, DONG-HUN; LEE, K; KIM CHI-KYUNG Characteristics of several bacterial isolates capable of degrading chloroaliphatic compounds via hydrolytic dechlorition. **The Journal of microbiology**, Changwon, p. 277-283, 2003.

SORKHOH, N.A.; IBRAHIM, A.S.; GHANNOUM, M.A.; RADWAN, S.S. High-temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwaiti desert. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 39, n. 1, p. 123-126, 1993.

SAIT, M.; DAVIS, K.E.R; JANSSEN, .P. Effect of ph on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum *acidobacteria* occurring in soil. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, p. 1852–1857, v. 72, n. 3, 2006.

STACH, J.E.M.; MALDONADO, L.A.; MASSON, D.G.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M.; BULL, A.T. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 6189–6200, 2003.

STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. **Plant Soil Science**, Lexington v. 49, n. 1, 1999

STRALHER, A.N.; STRALHER, A.H. **Geografia física**. 3.ed. Barcelona: Omega, 2000. 550p.

THERON, J.; CLOETE, E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. **Critical Reviews in Microbiology**, Philadelphia, v. 26, n. 1, p. 37–57, 2000.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 4876–4882, 1997.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.J.; GIBSON, T.J. ClustalW- improving the sensitivity of rogressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TINDAL, B. J. The archaeobacteria . In: BALOWS, A.; TRÜPER H. G; M. DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. **The prokaryotes**. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 677–808.

TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ V, V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N.F.; MELLO, J.W.V.; COSTA, L.M.. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. v. 2, p. 195-276.

TWILLEY, R.R. Coupling of mangroves to the productivity of estuarine and coastal waters. In: JANSSON, B.O. (Ed.). **Coastal-offshore ecosystem interactions**. New York: Springer-Verlag, 1988. p. 155-180.

URAKAWA, H.; YOSHIDA, T.; NISHIMURA, M.; OHWADA, K. Characterization of depth-related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinone profiling. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 2, n. 5, p. 542-554, 2000.

VANCE, E.D.; BROOKES P.C.; JENKINSON, D.S. Na extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 703-707, 1987.

VANNUCCI, M. **Os manguezais e nós: uma síntese de percepções**. São Paulo: Editora da USP, 1999. 233p.

VanTRAPPEN, S.; VANDECANDELAERE, I.; MERGAERT, J.; SWINGS, J. *Flavobacterium degerlachei* sp. nov., *Flavobacterium frigoris* sp. nov. and *Flavobacterium micromati* sp. nov., novel psychrophilic bacteria isolated from microbial mats in Antarctic lakes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 85-92, 2004.

von CANSTEIN, H.; KELLY, S.; LI, Y.; WAGNER-DÖBLER, I. Species diversity improves the efficiency of mercury-reducing biofilms under changing environmental conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 2829-2837, 2002.

WAGNER-DOBLER, I.; BEIL, W.; LANG, S.; MEINERS, M.; LAATSCH, H. Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, New York, v. 74, p. 207-238, 2002.

WARD, I.A.K.; LARCOMBE. Stratigraphic control of the geochemistry of Holocene innershelf facies, Great Barrier reef. **Marine Geology**, Amsterdam, v. 129, n. 1/2, p. 47-62, 1995.

WEBSTER, G.; WATT, L.C.; RINNA, J.; FRY, J.C.; EVERSLED, R.P.; PARKES, R.J.; WEIGHTMAN, A.J. A comparison of stable-isotope probing of DNA and phospholipid fatty acids to study prokaryotic functional diversity in sulfate-reducing marine sediment enrichment slurries. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 1575-1589, 2006.

WEIDNER, S.; ARNOLD, W.; STACHEBRANDT, E.; PÜHLER, A. Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with leaves of the seagrass *Halophila stipulacea* by a culture-independent small-subunit rRNA gene approach. **Microbial Ecology**, New York, v. 39, p. 22-31, 2000.

WIDADA, J.; NOJIRI, H.; KASUGA, K.; YOSHIDA, T.; HABE, H.; OMORI, T. Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from geographically diverse sites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 202-209, 2002.

WILLEMS, A.; DeVOS, P.; DeLEY, J. The genus *Comamonas*. In: BALOWS, A.; TRUPER, G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. **The prokaryotes** 2nd. New York: Springer, 2003. v. 3, p. 2583-2590.

WILLIAMS, H.N.; SCHEOFFIELD, A.J.; GUETHER, D.; KELLEY, J.; SHAN, D.; FALKER, W.A. Recovery of bdellovibrios from submerged surfaces and other aquatic habitats. **Microbial Ecology**, New York v. 29, p. 39-48, 1995.

WOODWELL, G.M.; WHITHNEY, D.E.; HALL, C.A.S. HOUGHTON, R.A. The flax pond ecosystem study: Exchanges of carbon in water between a salt marsh and Long island Sound. **Limnology and Oceanography**, Hampton, v. 22, n. 5, p.833-838, 1977.

WRIGHTON, K.C. **The search for bacteria involved in anaerobic petroleum degradation**. 2005. 94p. Thesis (Master of Science in Biological Sciences) Faculty of the Biological Sciences Department California Polytechnic State University, San Luis Obispo, 2005.

YAKIMOV, M.M; GIULIANO, L., DENARO, R.; CRISAFI, E. CHERNIKOVA, T.N.; ABRAHAM, W.R.; LUENSDORF, W.; TIMMIS, K.N.; GOLYSHIN, P.N. *Thalassolituus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks V.54, P.141–148, 2004.

YAMADA, T.; SEKIGUCHI, Y.; IMACHI, H.; KAMAGATA, Y.; OHASHI, A.; HARADA, H. Diversity, Localization, and Physiological Properties of Filamentous Microbes Belonging to *Chloroflexi* Subphylum I in Mesophilic and Thermophilic Methanogenic Sludge Granules **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, p. 7493–7503, 2005.

YOUNG, J. M.; KUYKENDALL, L. D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 51, p. 89–103, 2001.

ZHANG, H.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; HUGENHOLTZ, P.; KIM, H.; KAMAGATA, Y.; NAKAMURA, K. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 53, p. 1155-1163, 2003.

ZHOU, J.; XIA, B.; HUANG, H.; PALUMBO, A.V.; TIEDJE, J. M. Microbial Diversity and Heterogeneity in Sandy Subsurface Soils **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v, 70, n.3, p. 1723–1734, 2004.

ANEXO A

Imagem da Baixada Santista e localização da cidade de Bertioga

ANEXO B

Localização do manguezal do rio Iriri

ANEXO C

A e B: Área de manguezal e leito do Rio-Iriri, dominadas por diferentes tipos de vegetação. C e D: representam como foi realizada a amostragem

ANEXO B

Imagem e esquema da estratificação e armazenagem das amostras. A e B, estratificação; C, armazenadas a 4 °C para análises químicas; D, armazenadas em -80 °C para análises moleculares. Etapas realizadas em laboratório