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

**Diversidade da comunidade de fungos em solos de manguezais do Estado de
São Paulo**

Cristiane Cipola Fasanella

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

**Piracicaba
2012**

Cristiane Cipola Fasanella
Bióloga

**Diversidade da comunidade de fungos em solos de manguezais do Estado de
São Paulo**

Orientador:
Profa. Dra. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

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

**Piracicaba
2012**

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

Fasanella, Cristiane Cipola

Diversidade da comunidade de fungos em solos de manguezais do Estado de
São Paulo / Cristiane Cipola Fasanella.- - Piracicaba, 2012.
98 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Ecossistemas de mangue 2. Eletroforese 3. Fungos 4. Microbiologia do
solo 5. Petróleo 6. Salinidade do solo I. Título

CDD 631.46
F248d

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

À minha família Angelo, Waldirleene,
Cláudia, Giulia e Benedita Vilela Cipolla;
por me proporcionarem o melhor do
ser humano: a educação e o caráter,
Dedico

Ao meu filho Fellipe e o pequeno Giovanni
que em meio a minha caminhada
transformaram minhas perspectivas...
E ao meu marido que trilha comigo as
minhas caminhadas partilhando cada
nova perspectiva...
Ofereço

AGRADECIMENTOS

Aos meus guias espirituais por guiarem-me até um caminho sempre iluminado e cheio de boas energias;

À minha orientadora Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner pela orientação, amizade, dedicação, acolhimento e principalmente carinho durante o doutorado;

Ao curso de pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade e acolhimento desde o Mestrado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) pela bolsa concedida durante esses anos;

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

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pela presença e apoio durante esse trabalho;

Ao Dr. Itamar Soares de Melo pela confiança, acolhimento, ensinamentos e principalmente por ter se tornado um grande amigo e um modelo a seguir em vários aspectos pessoais e profissionais;

Ao João (Embrapa) por ser uma pessoa de um incrível caráter, um excelente técnico, pelas ajudas em coletas e no laboratório e por se tornar também um grande amigo juntamente com sua família (Magali e Rafael);

À Dr. Marli Fiore e Dra. Siu Mui Tsai pela disponibilização do laboratório e equipamentos em um período do meu doutorado e à Dra. Janaina Rigonato pela ajuda, ensinamentos e amizade;

Ao pessoal do laboratório da Marli pelo companheirismo no período em que lá estive;

Aos colegas do laboratório de Genética de Micro-organismos pela convivência durante o desenvolvimento do trabalho;

Aos colegas Dig, Metal, Armando e Polé pela grande amizade e convivência nesse período. Sem vocês meus dias não teriam sido tão divertidos. Obrigada por tudo que me proporcionaram;

Ao grande amigo Armando Dias primeiro pela amizade e também por todo o resto que me proporcionou. Obrigada por toda a ajuda e ensinamentos nesse trabalho, por toda a paciência, pelas longas conversas, por todas as risadas....enfim...por tudo! Obrigada por ter sido tão importante e essencial nesse período e por todo o resto da minha vida!!!!

Aos colegas do laboratório de Microbiologia do solo: Júlia Lima, Mylenne Pinheiro, Thiago Gumiere, Fábio Lino Soares Jr., Maryeimy Varon, Danice Luvizotto, Juliana Araújo, Josh

Halsey, Diogo Paes, Pedro Avelino, Ademir Durrer, Marcus Venicius (Polé), Armando Dias e Joelma Marcon; pela excelente convivência e momentos de descontração.

Aos demais amigos que estiveram presentes nesta etapa de minha vida: Smy, Natália, Tubafina, Tozado, Azeitona, Mayris, Família Almeida e seus agregados (Cris, Marcílio, Carol, Livia, Xico e Denis), Tiaguinho, Lícia, Natália, Jo, Olívia, Mariana, Milena, Júlia, Laura e Lilian;

Aos meus pais Angelo e Waldirlene, por toda a estrutura e amor;

À minha irmã Claudinha e minha sobrinha Giulia, pelo apoio e amor,

Aos meus cunhados Francisco Dini Andreote e Ana Paula Dini Andreote e também ao Felipe Cardena por se tornarem especiais e essenciais na minha vida,

Ao meu sogro Augusto Fernando Andreote por me ensinar a ver a vida de uma maneira que antes não conhecia e que juntamente com sua mulher, Fátima Saciloto, me proporcionaram momentos deliciosos e se tornaram minha família;

À minha sogra Fátima Dini por me dar um pouco do apoio de mãe e avó aqui quando precisei e por tudo que fez por mim e ao meu filho Fellipe;

Em especial ao meu marido Fernando Andreote que trilhou comigo um caminho maravilhoso, cheio de aprendizados, carinho, dedicação, companheirismo e muito amor. Por ser um excelente pai, marido, amigo e professor...na minha vida acadêmica me ajudando em tudo e na minha vida pessoal e emocional. Sem você eu não seria nada do que sou hoje e não teria chegado até aqui. Obrigada meu amor, por estar na minha vida.

*"Tudo o que acontece tem um significado.
Compreenda: sempre que um ciclo se fecha,
outro se abre; ou seja, os obstáculos são
portais para fazer de cada dificuldade
a entrada de uma nova possibilidade."
(Coen Sensei)*

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 DESENVOLVIMENTO	21
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1.1 O ambiente manguezal.	21
2.1.2 Papel dos fungos em ambientes de manguezais	23
2.1.3 Técnicas independentes de cultivo.....	26
2.1.3.1 Gel de eletroforese em gradiente desnaturante (DGGE – <i>denaturing gradient gel electrophoresis</i>)	29
2.1.3.2 Construção e análise de bibliotecas de clones	31
2.1.3.3 Quantificação de fungos por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	33
2.1.3.4 Pirosequenciamento.....	34
2.1.4 Metagenômica.....	37
2.1.5 Biodegradação e biorremediação de hidrocarbonetos em manguezais	38
2.2 Material e métodos.....	43
2.2.1 Manguezais e amostras avaliadas.....	43
2.2.2 Extração de DNA das amostras de sedimento	45
2.2.3 Quantificação da comunidade fúngica através da técnica de PCR em tempo real (qPCR)	45
2.2.4 Análise das comunidades fúngicas do sedimento de manguezais por meio de DGGE.....	46
2.2.5 Construção e análise de bibliotecas de clones da região intergênica ribossomal fúngica (ITS)	47
2.2.6 Análise das sequências obtidas	48
2.2.7 Análise da comunidade fúngica por pirosequenciamento da região ITS	49
2.2.8 Análise da comunidade eucariótica presente em sedimentos de manguezais por metagenômica descritiva	50
2.3 Resultados e discussão	50
2.3.1 Quantificação de fungos em sedimentos de manguezais por qPCR	51

2.3.2 Análise da comunidade fúngica dos manguezais avaliados por meio de DGGE ..	53
2.3.3 Análise da comunidade fúngica de sedimentos de manguezais por meio de bibliotecas de clones da região ITS	56
2.3.4 Análise da comunidade fúngica de sedimentos de manguezais por meio de pirosequenciamento da região ITS.....	62
2.3.5 Descrição da comunidade eucariótica de sedimentos de manguezais por meio de metagenômica descritiva	69
3 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
REFERÊNCIAS.....	75

RESUMO

Diversidade da comunidade de fungos em solos de manguezais do Estado de São Paulo

Os manguezais compõem um bioma de transição entre o ambiente marinho e terrestre característico de regiões tropicais e subtropicais. Dentro deste ambiente, a diversidade microbiana desempenha um importante papel na ciclagem de nutrientes. No entanto, a diversidade de fungos em manguezais é pouco estudada, bem como o estabelecimento de relações ecológicas entre esses organismos e o ambiente. Neste intuito, o presente trabalho teve como objetivo comparar a diversidade fúngica no sedimento de dois manguezais localizados na cidade de Bertioga [um contaminado com petróleo (OilMgv), e um manguezal próximo (AntMgv)]. As análises se basearam em metodologias independentes de cultivo, como a técnica de PCR-DGGE baseada na região ITS (*internal transcribed sequence*), que mostrou padrões complexos e uma grande abundância de bandas, sendo que dentro dos perfis obtidos é possível observar grupos selecionados para cada manguezal e para cada região dentro de um mesmo manguezal. A construção e análise de bibliotecas de clones também desta região mostraram a dominância de fungos afiliados aos filos Basidiomycota e Ascomycota, com destaque para a ocorrência dos gêneros *Epicoccum*, *Nigrospora* e *Cladosporium*. Uma análise mais ampla, por meio de pirosequenciamento permitiu uma melhor visualização destas comunidades e corroborou os dados anteriores, comprovando a ocorrência de grupos fúngicos distintos nos manguezais estudados (sequenciamento baseado em *amplicons* da região ITS), e permitindo a observação de outros grupos eucarióticos nos manguezais avaliados (análise de metagenômica). Em resumo, os dados apresentados constituem a primeira descrição robusta destas comunidades que desempenham funções essenciais à manutenção e ao funcionamento do ambiente estudado.

Palavras-chave: PCR-DGGE; ITS; Petróleo; Salinidade; Biblioteca de clones ITS

ABSTRACT

Diversity of the fungal community in mangrove soils of the São Paulo State

Mangroves ecosystems make up a transition biome between land and marine environments, particular occurring in tropical and subtropical regions. Within this environment, the microbial diversity plays an important role in nutrient cycling. However, the diversity of fungi in mangrove is still poorly studied, as well as the establishment of ecological relationships between these organisms and the environment. In this sense, this study aimed to compare the fungal diversity in the sediment of two mangroves located in the city of Bertioga [an oil-spilled mangrove (OilMgv) and a nearby unaffected mangrove (AntMgv)]. Analyzes were based on culture-independent methods, such as PCR-DGGE based on the ITS region (*internal transcribed sequence*), which showed complex patterns and an abundance of bands, allowing the observations of groups selected for each mangrove and each region inside the same mangrove. The construction and analysis of clone libraries showed the dominance of fungi affiliated with the phyla Ascomycota and Basidiomycota, with a remark for the occurrence of the genera *Epicoccum*, *Nigrospora* e *Cladosporium*. A more robust approach, performed by pyrosequencing, allowed better visualization of these communities, corroborating the previous results, reinforcing the differential occurrence of fungi groups in assessed mangroves (based on sequencing of the ITS region amplicons), and allowing the observation of other eukaryotic groups in these areas (metagenômica analysis). In summary, the present data provide the first robust description of these communities that perform essential roles for the functioning and maintenance of the studied environment.

Keywords: PCR-DGGE; ITS; Oil spill; Salinity; ITS library of clones

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema dos pontos de amostragem em cada manguezal avaliado, evidenciado a cobertura da diversidade nos pontos próximos ao mar ou rio (ponto 1), no centro do manguezal (Ponto 2) e também na área próxima ao continente (Ponto 3)	42
Figura 2 - Esquema da junção dos pontos amostrados para a montagem das bibliotecas de clones da região ITS de fungos	45
Figura 3 - Quantificação de cópias da região ITS fúngica em sedimentos de manguezais por meio de qPCR. Os valores indicam a média de três repetições biológicas, e as barras indicam o erro padrão de cada local amostrado	50
Figura 4 - (a) Perfil de DGGE da comunidade fúngica nos sedimentos dos diferentes manguezais e pontos avaliados. M indica as linhas com marcador, e as bandas marcadas indicam a seleção pela contaminação por petróleo. A figura b indica a análise correspondência (CA) mostrando os três primeiros eixos, onde um valor total de 36,8% da variância é explicada	52
Figura 5 - Proporção de sequências de ITS de fungos afiliados aos distintos grupos taxonômicos nas três áreas de manguezais avaliadas (a), e análise de rarefação das bibliotecas (b), determinada por agrupamento das sequências com 95% de similaridade.	56
Figura 6 - Árvore filogenética das sequências afiliadas ao gênero <i>Cladosporium</i> (a), <i>Nigrospora</i> (b) e <i>Epicoccum</i> (c). Sequências representativas de diferentes UTOs, determinadas a 95% de similaridade. Em negrito, encontram-se as sequências retiradas do manguezal determinado como OilMgv	58
Figura 7 - Filogenia das sequências afiliadas com fungos não cultiváveis e o grupo Basidiomicetos não cultiváveis encontrados nos diferentes sedimentos de manguezais	59
Figura 8 - Frequência relativa de sequências classificadas dentro dos filos Ascomycota e Basidiomycota em cada um dos grupos de sequências obtidos por meio de pirosequenciamento da região ITS	60
Figura 9 - Análise de NMDS com base nas frequências relativas de sequências alocadas a ordens, dentro dos grupos totais (a), Ascomycota (b) e Basidiomycota (c). Os valores de estresse estão indicados nas figuras	61
Figura 10 - Diagramas de Venn considerando todas as UTOs (a) e apenas aquelas compostas por mais de 10 sequências (b), evidenciando os grupos de fungos exclusivos e compartilhados dentre as áreas de manguezais estudadas.....	64

- Figura 11 - Distribuição das 62 UTOs compostas de mais de 10 sequências originadas dos sedimentos de manguezais. As cores na árvore indicam os diferentes grupos taxonômicos encontrados, e as barras indicam a frequência das UTOs dentro de cada uma das áreas estudadas. Nos ramos, a presença de círculos indica o valor de bootstrap superior a 50 66
- Figura 12 - Classificação taxonômica de sequências atribuídas ao domínio Eukarya em metagenomas de sedimentos de manguezais localizados na cidade de Bertioga. Essa figura representa a área NOilMgv 68
- Figura 13 - Classificação taxonômica de sequências atribuídas ao domínio Eukarya em metagenomas de sedimentos de manguezais localizados na cidade de Bertioga. Essa figura representa a área OilMgv 68
- Figura 14 - Classificação taxonômica de sequências atribuídas ao domínio Eukarya em metagenomas de sedimentos de manguezais localizados na cidade de Bertioga. Essa figura representa a área AntMgv 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Localização geográfica dos manguezais amostrados no Estado de São Paulo.	41
Tabela 2 - Análises físico-químicas dos pontos avaliados dentro dos dois manguezais amostrados.....	43
Tabela 3 - Número de sequências analisadas e índices ecológicos das comunidades de fungos de cada uma das áreas de manguezal estudadas.....	62

1 INTRODUÇÃO

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

Dessa forma, conhecer tal biodiversidade e entender como estes micro-organismos respondem às alterações ambientais presentes em diversos manguezais, ou mesmo em diferentes pontos dentro de um mesmo manguezal, pode auxiliar no melhor entendimento deste nicho ecológico, e dar suporte a projetos de pesquisa que visem a bioprospecção, com a busca de novas enzimas e biomoléculas em manguezais. Dentre diversos pontos a serem abordados na prospecção microbiana, pode-se destacar o uso destes organismos na biorremediação, que se baseia na utilização de mecanismos biológicos na recuperação de áreas impactadas por poluentes, como por exemplo, o petróleo. Assim sendo, comparar a diversidade de manguezais preservados e contaminados por hidrocarbonetos pode gerar dados sobre a seleção causada por este contaminante na comunidade fúngica, destacando a presença de grupos candidatos a serem utilizados em programas de biorremediação de manguezais. Vale ainda destacar a particularidade deste tipo de análise, onde as condições ambientais são de extrema importância, selecionando não apenas organismos capazes de degradar o contaminante, mas também capazes de sobreviver nas condições de baixa disponibilidade de oxigênio e constantes alterações de salinidade, frequentemente encontradas em manguezais.

Neste contexto, o principal objetivo desse trabalho é caracterizar o perfil da comunidade fúngica em dois manguezais distintos em relação a sua contaminação. Vale destacar que alguns dos dados gerados e apresentados nesse trabalho constituíram um artigo já publicado, sob o título *The Selection Exerted by Oil Contamination on Mangrove Fungal Communities*, publicado na revista *Water Air Soil Pollution*, volume 223, páginas 4233 à 4243.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 O ambiente manguezal

Por definição, o manguezal consiste de um ecossistema costeiro, de transição entre os ambientes terrestre e marinho, característicos de regiões tropicais e subtropicais, sujeito ao regime das marés. Este ecossistema é constituído de espécies vegetais lenhosas típicas (mangues), além de micro e macroalgas, adaptadas à flutuação de salinidade, e caracterizadas por colonizarem sedimentos predominantemente lodosos, com baixos teores de oxigênio e valores negativos de potencial redox (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

O estabelecimento e o desenvolvimento dos manguezais se relacionam diretamente às condições climáticas, hidrológicas e geomorfológicas. Sendo assim, temperaturas tropicais, amplitude de marés, presença de água doce (para permitir o estabelecimento de ambientes salobros) e relevos litorâneos, protegidos da ação destrutivas das ondas, constituem os requisitos básicos necessários para o desenvolvimento e a manutenção dos manguezais (VALE, 1999).

A distribuição geográfica dos manguezais está relacionada aos locais que favorecem a deposição de sedimentos, normalmente associados às planícies costeiras de baixa declividade ou vales fluviais alagados, limitados por baixios, estuários e deltas. Por isso, tal ecossistema apresenta-se amplamente distribuído, cobrindo cerca de 60 a 75% da linha costeira mundial (VANNUCCI, 1999). O Brasil, a Indonésia e a Austrália são os países mais abundantes em ecossistemas de manguezais, sendo que na América Latina, os manguezais cobrem cerca de 400.000 hectares (HOLGUIN et al., 2001). No Brasil, tal ecossistema ocorre ao longo do litoral, desde o Cabo Orange no Amapá, até o município de Laguna em Santa Catarina, abrangendo uma área de 25.000 km². O Estado de São Paulo apresenta uma área coberta por manguezais de 125km², distribuída desde Ubatuba (litoral Norte) até a cidade de Cananéia (litoral Sul), apresentando uma área de cobertura vegetal de 675 km² (GAMERO, 2001).

Os manguezais hospedam aproximadamente 70 espécies de plantas (derivadas de 20 famílias), espalhadas diferencialmente em manguezais nas diferentes áreas do mundo. Estas plantas desenvolveram adaptações morfológicas e fisiológicas para ocupar regiões com características como as encontradas em manguezais (DUKE, 2007). As florestas de mangue de todo o litoral brasileiro são compostas quase exclusivamente de três gêneros de plantas:

Laguncularia, *Avicennia* e *Rhizophora*. Além destas, em alguns manguezais, como os presentes no litoral Norte brasileiro, ocorrem representantes do gênero *Conocarpus*, que vivem preferencialmente nos bordos da floresta.

Essa vegetação pode representar um dos fatores determinantes nas estruturas das comunidades microbianas nesse ambiente. Além disso, deve-se também considerar a variação temporal a que uma comunidade microbiana está sujeita nos manguezais, devido às alterações de temperatura, aporte de matéria orgânica e disponibilidade de água e nutrientes. As características físico-químicas dos solos de manguezais podem variar em função dos ciclos das marés, das variações climáticas e atividade de fauna e flora (FERREIRA, 2002).

A água existente nos manguezais é constituída por uma mistura do escoamento superficial das águas da chuva e rios e da água do mar. As marés são responsáveis pelo suprimento de sal, nutrientes e matéria orgânica nos sedimentos de manguezais, além de promover a oxigenação do substrato (VANNUCCI, 1999). Já em relação ao solo desse ecossistema, pode-se dizer que são formados pela deposição de partículas de origem terrígena e marinha, orgânicas e inorgânicas, que estão em suspensão na água e se movimentam em função das correntes de fluxo e refluxo das marés. Através dessa ação mecânica, as partículas grossas se depositam primeiro, seguidas das partículas de argila e silte, as quais se agregam e decantam por floculação (VANUCCI, 1999; STRALHER & STRALHER 2000; WOODHOUSE et. al., 1974). Os solos dos manguezais podem apresentar características diferentes devido à variação na intensidade de geração e do transporte de partículas. O predomínio da fração silte é presente em canais de maré, devido às inundações diurnas e a deposição de sedimentos, sendo as frações mais finas de argila regularmente removidas e enxaguadas do manguezal por marés vazantes (GAMERO, 2001).

A importância deste ecossistema reside na amenização do impacto do mar na terra, como no controle da erosão devido à presença de raízes de mangue (estabilização física da linha da costa), retenção de sedimentos, nutrientes e poluentes; impedindo o assoreamento e a contaminação das águas costeiras, e também na grande produtividade biológica com alta diversidade de peixes, crustáceos, moluscos, aves, répteis e mamíferos, oferecendo suporte a inúmeras espécies (HERZ, 1991). Este ambiente desempenha, portanto, papel essencial na manutenção da biodiversidade marinha (CURY, 2002). Toda esta diversidade exige uma alta disponibilidade de nutrientes no início da cadeia trófica, onde surge a importância de não só da fotossíntese, mas também da atividade microbiana, que é a principal via de ciclagem de nutrientes do manguezal, atuando na decomposição da matéria orgânica e de outros compostos, presentes no ambiente de maneira natural ou devido à poluição. Pode-se dizer que

a microbiota forma a base da cadeia alimentar da flora e da fauna deste ecossistema, o que torna o ambiente altamente dependente dos micro-organismos. Com isso, é possível formular a hipótese de que, na ausência ou redução da microbiota, haverá prejuízo nas atividades ecológicas, possivelmente resultando na destruição dos manguezais (HANSON E HANSON, 1996, HOLGUIN et al., 2001).

Embora os manguezais apresentem uma alta taxa de matéria orgânica, há geralmente uma deficiência de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo (VAZQUEZ et al 2000;. HOLGUIN & BASHAN, 2001). Mas apesar desta limitação, são ambientes muito produtivos. Este paradoxo pode ser explicado por um sistema de reciclagem muito eficiente de nutrientes, onde a falta de nutrientes essenciais é mantida, sendo os novos nutrientes gerados pela decomposição da matéria orgânica, ressaltando novamente a hipótese descrita acima (SANTOS, 2011).

Apesar de saber que a organização e o funcionamento das comunidades microbianas são responsáveis pela maior parte desses processos biogeoquímicos (LYNCH; BRAGG, 1985), estudos de caracterização destas comunidades nos sedimentos e solos de mangues e marismas são ainda escassos, ao contrário do que ocorre para outros ecossistemas estuarinos (FRANKLIN et al., 2002; PURDY et al., 2002; BUCHAN et al., 2003; SMITH et al, 2004; LANOIL et al., 2005). Além disso, ambientes como esses, cujas comunidades microbianas são ainda pouco conhecidas, podem conter grandes reservatórios genéticos para a pesquisa e desenvolvimento de produtos biotecnológicos (BENLLOCH et al., 1995; LAMBAIS et al., 2005).

Vale ressaltar que o manguezal é considerado um recurso renovável, porém finito. No entanto, este ambiente passa a ser considerado um recurso não renovável quando são substituídos por outros usos do solo, ou ainda por atividades que os transformam em depositários de efluentes e lixo (SCHAEFFER-NOVELLI, 2000). Ainda, a importância deste ecossistema é aumentada se considerarmos que todo impacto ambiental, seja este de origem industrial ou antropológica, têm levado os manguezais a uma situação insustentável, que o coloca como um ambiente em extinção na superfície terrestre (DUKE et al., 2007).

2.1.2 Papel dos fungos em ambientes de manguezais

Dentro do domínio Eukarya, o reino Fungi possui uma enorme diversidade, onde se acredita existir algo próximo a 1,5 milhões de espécies. Estes organismos possuem diversos sistemas de sobrevivência nos mais diferentes ambientes, sendo descrita a tolerância até mesmo à condições ambientais extremas, como temperaturas variando de -5 a $+60$ °C, pH

1,0 a 9,0, baixa umidade, e até mesmo uma quantidade mínima de oxigênio (por exemplo 0.2%). Com isto, a presença e o desenvolvimento dos fungos são capazes de influenciar na composição das comunidades de plantas e em processos chave para o funcionamento dos ecossistemas (SMITH et al., 1997; HAWKSWORTH, 2001; VAN DER HEIJDEN et al., 2008). Para melhor exemplificar este tipo de efeito, podemos usar os estudos que mostram que a alta diversidade de fungos saprófitos aumenta a taxa de decomposição da matéria orgânica no solo (SETALA et al., 2004; TIUNOV et al., 2005), ou os trabalhos que descrevem a grande diversidade de fungos micorrízicos como organismos essenciais no desenvolvimento das plantas, onde atuam auxiliando na captura de nutrientes, podendo ser responsáveis pela maior diversidade de plantas em determinados ambientes (APINIS, 1972; CARROLL et al. 1992; VAN DER HEIJDEN et al., 1998).

Dentre os micro-organismos que compõem a biomassa do solo, os fungos merecem destaque por se tratar do principal grupo decompositor da matéria orgânica complexa, degradando a celulose e a lignina, além de outros polímeros amplamente encontrados em áreas florestais. São essenciais para a ciclagem e transporte de nutrientes para as plantas, além de exercer papel importante na supressão de doenças (THORN, 1996, DORAN; HILL et al., 2000).

Considerando que os fungos representam uma das últimas fronteiras da biodiversidade desconhecida, e que desafiam a ecologia microbiana, é importante destacar que eles possuem um papel crucial no funcionamento do ecossistema, sendo de grande valia para a manutenção do equilíbrio ecológico; uma vez que influenciam inúmeros processos ambientais, como a ciclagem de nutrientes na cadeia alimentar. A partir de estudos em sistemas de solo, os fungos são conhecidos por serem vitais na ciclagem de nutrientes por meio do metabolismo dos complexos materiais orgânicos (TRESSEDER, 2005; WATLING, 2005).

Além da importância para os ecossistemas, muitos estudos têm buscado descrever os fatores que geram e mantêm a diversidade de fungos no ambiente. A distribuição da biodiversidade através de gradientes ambientais como latitude, altitude, produtividade e salinidade tem sido alvo de grande interesse para os ecólogos (FISHER, 1961; ROSENZWEIG, 1995). Alguns trabalhos destacam dentre os diferentes parâmetros ambientais, a importância da disponibilidade de nitrogênio mineral (ALLISON et al., 2007), a fonte nutricional (WALDROP et al., 2006) e a concentração de CO₂ atmosférico (KLAMER et al., 2002), como os principais fatores capazes de interferir na ocorrência de fungos no ambiente.

Com toda a sua versatilidade metabólica, os fungos são capazes de degradar uma vasta lista de compostos, dentre os quais se destacam os poluentes orgânicos. Dentro deste contexto, os grupos fúngicos mais frequentemente descritos como promotores da decomposição de tais contaminantes são os pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota (HAWARI et al., 2000.; PINEDO-RILLA et al., 2009; SCHMIT & MUELLER, 2007).

Tendo em vista a importância dos fungos, e sua potencialidade na degradação de compostos orgânicos e poluentes, o conhecimento da diversidade biológica e funcional de fungos no ecossistema de manguezal é de grande relevância, gerando uma descrição quase que completa desses organismos que habitam tal ambiente. Ainda, devido ao grande número de estudos realizados com bactérias, a exploração do potencial fúngico na degradação de poluentes ambientais, surge como uma importante área de estudo na biotecnologia e biorremediação de áreas contaminadas (TRESEDER, 2005; WATLING, 2005; HARMS et al., 2011). Estudos relacionados à diversidade microbiana em manguezais têm avaliado comunidades bacterianas em manguezais conservados (DIAS et al. 2010), manguezais perturbados pelas atividades antrópicas (GOMES et al. 2008), manguezais afetados por fazendas de criação de camarão (SOUSA et al. 2006) e contaminados por hidrocarbonetos (Taketani et al. 2010a). No entanto, a maioria desses estudos se concentra nas comunidades bacterianas, negligenciando a diversidade dos fungos em tais ambientes.

Alguns trabalhos realizados neste sentido mostraram a presença destes organismos nos manguezais. Alias (1996) listou 339 fungos em manguezais, onde a maioria (151 espécies contidas em 84 gêneros) mostrou-se afiliadas aos ascomicetos, distribuídos como saprófitos, biotróficos e patógenos. Citrón & Schaeffer-Novelli (1983) destacam o papel de bactérias e fungos em manguezais, onde atuam como agentes decompositores da matéria orgânica produzida por produtores primários. Hagler et al. (1993) e Araújo et al. (1995) estudaram leveduras em águas de bromélias encontradas em manguezais no Rio de Janeiro. Costa (2003) isolou e identificou fungos endofíticos de plantas presentes no manguezal do Rio Paripe, (Ilha de Itamaracá, Pernambuco). Dessa forma, no Brasil, o conhecimento de fungos em manguezais ainda é muito incipiente, onde os estudos realizados se referem apenas a fungos cultivados (BONONI, 1984; ALMEIDA FILHO et al., 1993; GUGLIOTTA & CAPELARI, 1995; GUGLIOTTA & BONONI, 1999; CAMPOS & CAVALCANTI, 2000 e CAMPOS et al., 2005), o que despreza a fração não-cultivada desta comunidade, que deve ser de grande importância, como observado em muitos outros ambientes estudados. Outros trabalhos, realizados fora do Brasil, indicam esta abundância de grupos não cultivados em

áreas de manguezais. Como exemplo disso, Arfi et al. (2012) descreveram a especificidade da colonização de fungos em espécies de plantas neste ecossistema (*Avicennia marina* e *Rhizophora stylosa*) utilizando a técnica de pirosequenciamento da região ITS, onde demonstraram que abordagens similares podem levar a uma maior compreensão dos fungos que residem no ecossistema manguezal. Também, Vittal et al. (2006) realizaram uma revisão sobre a diversidade e a ecologia de fungos em manguezais da costa leste da Índia.

Os fungos que colonizam os diferentes nichos dos manguezais podem ser divididos em terrestres (que colonizam as partes da planta acima da coluna de água) e fungos marinhos (que colonizam as partes inundadas completamente ou intermitentemente pelas águas das marés). Na interface, uma mistura de ambos os fungos terrestres e marinhos também podem ocorrer, mas em menor intensidade devido à baixa oxigenação desse ambiente.

2.1.3 Técnicas independentes de cultivo

Apesar de seus importantes papéis nos ecossistemas serem bem documentados, e que apenas 5% das espécies de fungos terem sido descritas, o conhecimento sobre a dinâmica populacional dos fungos, a organização das comunidades e a diversidade deste grupo são ainda restritos (HAWKSWORTH, 2001). Das espécies de fungos conhecidas, estima-se que apenas 17% pode se desenvolver em meio de cultura, e embora possam ser cultivadas, em muitos casos, não é possível germinar estruturas latentes como esporos, ocorrendo apenas o micélio vegetativo, o que dificulta a identificação das espécies (BRIDGE; SPOONER, 2001). Isto se deve basicamente às limitações inerentes às técnicas de cultivo, uma vez que todos os meios de cultura são seletivos em maior ou menor extensão para os diversos grupos de micro-organismos e, na maioria das vezes, incapazes de reproduzir as condições encontradas no ambiente. Com isso, o uso de técnicas independentes de cultivo tem mudado drasticamente nossa perspectiva sobre a diversidade microbiana na natureza (AMANN et al., 1995; TORSVIK et al., 2002).

A aplicação de técnicas baseadas na detecção e análise da diversidade de ácidos nucléicos (DNA ou RNA) presentes em amostras ambientais é fundamental nos estudos de diversidade microbiana, principalmente por permitir a análise de maneira independente do cultivo das comunidades microbianas presentes nas amostras, o que exclui todos os problemas e limitações devidos à baixa culturabilidade dessas (ANDREOTE, 2007).

A escolha entre DNA ou RNA para o estudo de comunidades microbianas é um assunto bastante questionado. O DNA extraído do solo representa o metagenoma total,

incluindo DNA de células não viáveis. Por outro lado, o RNA é sintetizado apenas por células em crescimento e é degradado rapidamente após a morte da célula. Com isso pode-se identificar os membros funcionais da comunidade microbiana do solo, levando a inferências mais precisas sobre funções (McGRANT et al., 2008). Porém, o RNA é mais sensível à degradação por processos inadequados de manuseio ou estocagem. Por isso, pode ser mais difícil o controle da qualidade e integridade desse ácido nucléico durante as análises (PEREZ-NOVO et al., 2005).

A maioria das técnicas moleculares aplicadas a estudos microbiológicos baseia-se nas diferenças de composição dos genes ribossomais. Em bactérias, o gene 16S ribossomal (16S rRNA) é o mais amplamente utilizado, considerado uma importante molécula para o estudo de filogenia e ecologia microbiana (LOUWS et al., 1999). O sequenciamento desse gene permite a identificação de micro-organismos no nível de gênero e possivelmente no nível de espécie, como também pode permitir correlações entre o genótipo e o ambiente estudado (CHENEY et al., 2000). Com base nesta metodologia, a diversidade bacteriana foi acessada em vários ambientes baseando-se nos genes 16S rRNA das espécies microbianas componentes destas comunidades, revelando a grande diversidade que deixa de ser explorada quando apenas os métodos baseados em cultivo são aplicados (HEAD et al., 1998; PROSSER et al., 2007). Para fungos, a mesma metodologia é validada (ANDERSON, 2003ab), sendo tais técnicas essenciais na obtenção de informação de todos os fungos presentes no ambiente, permitindo novos conhecimentos e significativos avanços na descrição das comunidades fúngicas nos mais diversos ambientes. Neste contexto, o gene 18S rRNA ou as regiões intergênicas ribossomais (ITS) do DNA ribossômico são amplamente usados como marcadores moleculares para fungos devido a presença de regiões conservadas e variáveis nesta região do genoma, além de um grande número de sequências disponíveis em banco de dados (ANDERSON, 2003ab; BEGEROW et al., 2010; PORTER; GOLDING, 2011).

No entanto, o maior desafio na aplicação dessas técnicas para o estudo de comunidades fúngicas é a obtenção de *primers* específicos para o grupo dos fungos, reduzindo assim a amplificação de DNA oriundo de outros eucariotos presentes nas amostras analisadas. Neste intuito, vários *primers* tem sido descritos para amplificar genes ribossomais de fungos de diversos grupos taxonômicos (WHITE et al., 1990; BORNEMAN et al., 2000), buscando cada vez mais esta especificidade, que quando ausente, pode levar a uma estimativa errada da diversidade de fungos no ambiente em estudo. Gardes and Bruns (1993) desenharam os conhecidos e amplamente utilizados *primers* ITS1-F e ITS4-B, para amplificar especificamente regiões de ITS do operon ribossomal de fungos (Ascomycota,

Basidiomycota, Chytridiomycota and Zygomycota). Alternativamente, outros *primers* também podem ser usados para este tipo de estudo, porém estes são menos frequentes na literatura (SMIT et al., 1999; BORNEMAN et al., 2000). O trabalho de Anderson et al. (2003) avaliou uma série de *primers* descritos para o estudo de fungos no solo, e demonstrou por clonagem e identificação dos organismos alvos de cada conjunto de *primers*, alguns *primers* que apresentaram um maior número de sequências de fungos quando comparadas com o banco de dados.

Considerando estas limitações, e buscando o melhor uso possível dos *primers* disponíveis, é possível estudar a comunidade de fungos presentes em diferentes ambientes, seja por métodos de *fingerprinting*, ou pela construção e análise de bibliotecas de clones do gene alvo de amplificação, o que permite uma análise filogenética da comunidade fúngica acessada.

Dentre os métodos de *fingerprinting* podem-se citar vários métodos de separação de *amplicons* que podem ser utilizados para estudo da estrutura das comunidades de fungos e permitem a identificação de modificações nas comunidades ao longo do tempo, ou em diferentes áreas, ou sob diferentes tratamentos. Dentre tais métodos, os mais utilizados são o polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição terminal (T-RFLP), a análise automatizada do espaço intergênico ribossomal (ARISA), o polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP) e a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) (MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993; AVANISS-AGHAJANI et al., 1994).

Comunidades de fungos responsáveis por atividades particulares podem ser estudadas através da marcação *in situ*, a qual relaciona funções com a identidade taxonômica. Substratos podem ser marcados com isótopos radioativos, permitindo a micro-autoradiografia de células que incorporaram a marcação. Marcação de substratos com isótopos estáveis também é possível. Na técnica conhecida como SIP (sondagem com isótopos estáveis), substratos marcados com $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ são incorporados ao DNA e rRNA das células dos micro-organismos que metabolizam o substrato escolhido. Após a extração dos ácidos nucleicos do solo, a fração marcada pode ser separada da fração sem marcação por centrifugação em gradiente de densidade, clonada e caracterizada. Assim, grupos metabolicamente ativos podem ser identificados posteriormente (HIRSCH; MAUCLINE; CLARK, 2010).

2.1.3.1 Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante (DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

O DGGE é um método de estudo utilizado em levantamentos e comparações na composição e diversidade de comunidades microbianas (RANJARD et al., 2000). A técnica de DGGE foi utilizada primeiramente por Muyzer, De Waal e Uitterlinden (1993) e consiste na separação dos fragmentos de DNA de mesmo tamanho em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear dos desnaturantes formamida e ureia; e com isso é capaz de separar *amplicons* de PCR de tamanhos similares com base na diferença de composição de nucleotídeos (G+C) ao longo do gel (MUYZER et al., 1993). Quando sequências com composições similares de bases atingem o gradiente de desnaturação em uma determinada posição no gel, a migração acaba. Por outro lado, sequências de composição distintas irão parar de migrar em diferentes posições devido à variação de gradiente de desnaturação e, assim, podem ser separadas pelo DGGE. Muyzer, De Wall e Uitterlinden (1993) definiram esta técnica como muito apropriada não somente para caracterizar comunidades complexas, como também para estudar as mudanças ocorridas nas comunidades microbianas no ambiente natural, submetidos às condições de estresse, ou no monitoramento de micro-organismos específicos no ambiente; além de importantes para inferir filogenia dos membros da comunidade, testar pureza de linhagens bacterianas, monitorar o isolamento de micro-organismos a partir de amostras ambientais e acompanhar a dinâmica de populações específicas em função de variações ambientais (ROSADO & DUARTE, 2002).

A técnica apresenta alta resolução na qual um grande número de amostras pode ser rapidamente comparado revelando a dinâmica de comunidades microbianas. (MUYZER; SMALLA, 1998). Através de tal técnica, também é possível determinar alterações na estrutura de uma comunidade fúngica em amostras diferentes, permitindo a comparação rápida e de baixo custo da estrutura dessas comunidades do solo. (MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993; VAN ELSAS et al., 2000; ANDERSON et al., 2003; VALÁŠKOVÁ; BALDRIAN, 2009).

O perfil de bandas de DNA no gel de DGGE pode ser visualizado a partir de diferentes colorações. A fluorescência conferida por corantes intercalantes ao DNA como exemplo o brometo de etídeo e outros corantes fluorescentes, apesar de produzir menos *background* pode deixar de corar bandas com menor conteúdo de DNA. O nitrato de prata mostra um resultado mais representativo, com maior resolução e é capaz de corar bandas de menor massa de DNA (MUYZER; SMALLA, 1998).

Com a ampla utilização da técnica de DGGE no estudo de comunidades microbianas, a simples comparação visual entre os perfis das comunidades passou a não fornecer toda informação possível de ser obtida por meio da aplicação desta técnica. Desta maneira, os perfis de DGGE foram utilizados para aplicação de diferentes técnicas de análise, que se iniciou por comparação das curvas densitométricas e, posteriormente, na utilização dos dados (qualitativos ou quantitativos) gerados em análise multivariada. A aplicação da análise multivariada em estudos de comunidades microbianas é recente, tendo como principal vantagem a avaliação conjunta de vários fatores envolvidos na determinação da composição dessas comunidades de forma conjunta. Os fatores determinantes da comunidade de bactérias de solo foram os primeiros a serem estudados utilizando esta estratégia (STEENWERTH et al., 2002). Posteriormente, a influência do histórico do solo e do cultivo de diferentes espécies de plantas na determinação da comunidade de *Burkholderia* spp. foi determinada por meio da utilização da análise multivariada (SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004). A seleção de componentes da população de *Pseudomonas* spp. na rizosfera de plantas também foi estudada por análise multivariada (COSTA et al., 2006). Neste estudo os autores determinam por análise multivariada o efeito rizosférico como determinante da composição da população de *Pseudomonas* spp. ao invés dos locais de cultivo.

Para aplicação da técnica de análise multivariada em dados de DGGE, as imagens dos géis, normalizadas e convertidas, são transformadas em matrizes de presença/ausência de bandas que passam a ser tratadas como espécies. Da mesma maneira, as intensidades relativas das bandas são consideradas a frequência de ocorrência destas espécies nas comunidades microbianas a serem avaliadas (SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004).

Anderson et al. (2003), desenvolveram um trabalho no qual a técnica de DGGE foi escolhida como o método de *fingerprinting* devido à capacidade da técnica para fornecer uma indicação rápida visual de alterações na estrutura da comunidade microbiana e de modo que as bandas individuais podem ser retiradas e sequenciadas na tentativa de identificar a sua origem.

Ying and Jong (2008), estudaram duas abordagens para analisar diretamente a diversidade microbiana no óleo concentrado Tapis bruto da Malásia: as bibliotecas de DNA ribossômico e DGGE. Tal estudo forneceu informações importantes sobre a ocorrência de grupos microbianos em uma concentração de petróleo bruto, apoiada por relatórios anteriores sobre as ocorrências de biodegradação aeróbia (ATLAS, 1992) e anaeróbia (AITKEN ET AL., 2004; RÖLING et al., 2003) de fontes de petróleo da Terra. Pennanen et al. (2004)

identificaram através da técnica de DGGE da região 18S rRNA que perfis gerados a partir de solo arável derivado RNA e DNA foram bastante semelhantes.

2.1.3.2 Construção e análise de bibliotecas de clones

Metodologias moleculares desenvolvidas nas últimas décadas (extração de ácidos nucleicos, amplificação por PCR, clonagem e sequenciamento de DNA) têm sido otimizadas e adaptadas para superar as limitações impostas pela abordagem clássica de estudo de populações microbianas, evitando o isolamento e cultivo dos micro-organismos. A utilização destas metodologias vem permitindo uma mudança drástica na perspectiva da diversidade microbiana no ambiente e a descrição de novos grupos de organismos, nunca antes cultivados (HUGENHOLTZ et al., 1998; RAPPÉ & GIOVANNONI, 2003).

A abordagem mais utilizada para o estudo de comunidades microbianas em amostras ambientais é a amplificação, clonagem e sequenciamento de genes ribossomais presentes nos organismos da comunidade, os quais são utilizados para sua identificação (JESUS, 2008). Essa técnica é conhecida como biblioteca de clones de genes alvo e é uma ferramenta de alta sensibilidade no estudo de comunidades microbianas, que possibilita a comparação entre genótipos de micro-organismos não cultivados, que representam 99% do total de espécies presentes em amostras ambientais (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005; TINGRE; RUBIN, 2005; SCHLOSS et al., 2009).

Os genes 16S e 18S rRNA tornaram-se a região alvo mais utilizada para estudos de filogenia de procariotos e eucariotos, respectivamente, fornecendo uma composição geral da comunidade. Os genes rRNAs são universalmente distribuídos nos diferentes grupos de seres vivos, sendo a molécula que apresenta maior grau de conservação existente e sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão em diferentes regiões da molécula (LANE et al., 1985).

Basicamente, o processo de construção de bibliotecas consiste na extração do DNA/RNA dos organismos da comunidade; as sequências de interesse são amplificadas por PCR ou transcriptase reversa (para o caso de RNA), os fragmentos amplificados são clonados, em vetores (geralmente plasmídeos) e esses são inseridos em células competentes de *Escherichia coli*, onde são multiplicados. O vetor é extraído das células e o fragmento clonado é sequenciado. O sequenciamento é realizado nas diferentes cópias do gene obtidas por PCR e sua comparação é feita com base de dados, fornecendo assim informações sobre a diversidade filogenética dos organismos presentes no material estudado (JESUS, 2008).

Brown et al. (2005) afirmaram que as bibliotecas de clones fornecem informações detalhadas de sequências representativas da comunidade, e seu papel na descrição da diversidade e no estabelecimento da filogenia é inquestionável. Estudos recentes têm confirmado que esta forma de análise é uma fonte vasta de recursos para a prospecção de novos grupos de interesse biotecnológico (COURTOIS, et al., 2003) e, combinados com técnicas mais rápidas e menos onerosas, como o DGGE e T-RFLP, fornecem informações consistentes da composição das comunidades microbianas nos mais variados ambientes.

A comunidade fúngica do solo de florestas foi caracterizada por meio da aplicação desta técnica, onde os autores identificaram uma grande diversidade, obtendo 412 filotipos com a análise de 863 sequências clonadas (O'BRIEN et al., 2005). Utilizando a mesma técnica para estudos de comunidades bacterianas foi possível determinar a enorme diversidade de bactérias que colonizam a superfície de folhas de árvores na floresta Atlântica (LAMBAIS et al., 2006).

No caso de *primers* para fungos, há pouca informação disponível sobre a influência da especificidade do sistema de detecção na descrição da diversidade deste grupo. Em solos agrícolas, por exemplo, existem poucos relatos baseados em análises de bibliotecas de clones (GIRVAN, et al., 2004; GOMES, et al., 2003; HOSHINO; MATSUMOTO, 2007; SEKIGUCHI, et al., 2008).

Análises de bibliotecas de clones visando especificamente o estudo de comunidades de fungos, geralmente as regiões alvo dentro do RNA ribossomal (rRNA) são as sequências SSU rRNA e regiões de ITS. Ambas são secções de DNA localizados entre o SSU (18S) e grande subunidade LSU (28S) rRNA, separados pelo gene rRNA 5.8S. A natureza variável das regiões ITS em relação aos genes rRNA permite maior precisão e resolução ao atribuir sequências de gênero-espécie e nível de classificações dentro de grupos (BRUNS & GARDES, 1993; HORTON & BRUNS, 2001). Este processo é facilitado quando as sequências estão bem amostradas e identificadas nos bancos das bases de dados (BUCHAN et al., 2002; JAMES et al., 2006a; O'BRIEN et al., 2005). A abordagem baseada em ITS é útil para determinar a diversidade de grupos fúngicos e pode ser utilizada para comparações de ecossistemas. No entanto, esta metodologia é de uso limitado para inferir relações filogenéticas de alto nível e identificação de grupos novos (HORTON & BRUNS 2001).

Um estudo realizado por Jebaraj et al. (2009) examinou a diversidade de fungos em regiões anóxicas do Mar Árabe, utilizando métodos de bibliotecas de clones, identificando 48 diferentes filotipos fúngicos. Bass et al. (2007); Le Calvez et al. (2009) e Jebaraj et al. (2009) também lançaram mão de tal metodologia para realizar estudos em

amostras de sedimentos, e ambientes anóxicos e notaram que a diversidade de fungos aumenta significativamente quando comparados a estudos em outros ambientes marinhos.

2.1.3.3 Quantificação de fungos por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma ferramenta altamente sensível capaz de detectar e quantificar os produtos de amplificação de uma reação de PCR (RAEYMAEKERS, 2000). Esta detecção é realizada por meio de marcadores fluorescentes presentes na reação de amplificação. O marcador fluorescente mais comumente utilizado é o corante *SYBR Green I*, que possui a capacidade de se intercalar à dupla fita de DNA e emitir o sinal fluorescente, quando excitado, no comprimento de onda de 494 a 521nm. O sinal emitido é então quantificado e utilizado para determinar a quantidade de amplificação presente neste momento na reação. Com o decorrer da amplificação, quando um valor arbitrário de amplificação é atingido, é alcançado o valor chamado de Ct (limiar do ciclo de detecção - *cycle threshold*). Este valor de Ct é o utilizado na estimativa de quantidade de DNA presente inicialmente na reação de PCR (ANDREOTE, 2007).

Esta técnica pode ser utilizada com duas abordagens distintas: quantificação relativa ou absoluta. A quantificação relativa indica variações quantitativas em uma sequência alvo comparado a um gene de referência, estimando alterações em nível de expressão do RNAm. Já a quantificação absoluta expressa a quantidade exata de ácidos nucleicos em relação a uma unidade específica (ng/reação, cópias do gene/mL, cópias do gene/g de solo, etc) (FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999).

Nos últimos anos a qPCR surgiu como uma ferramenta promissora para o estudo de comunidades microbianas do solo (KABIR et al., 2003; KOLB, et al., 2003; OKANO et al., 2004; STUBNER, 2002; ROUSK et al., 2010) e entre os métodos de análise de comunidade é algo bastante interessante e promissor, já que permite uma avaliação relativamente rápida e quantitativa da abundância de grupos filogenéticos específicos de micro-organismos da amostra estudada (FIERER et al., 2005).

De acordo com Hawksworth (2001), Straatsma et al. (2001) e Torsvik et al. (2002) a diversidade das comunidades de bactérias e fungos no solo é extraordinária. Song et al. (2011) relataram que a técnica de qPCR foi utilizada para examinar a colonização fúngica em madeira e análises físico-químicas dos resíduos resultantes da deterioração gerados foram usados para quantificar os resultados dos e como referência para a confirmação de resultados qPCR.

Fierer et al. (2005) descreveram uma abordagem baseada em qPCR para avaliar estrutura da comunidade microbiana do solo em níveis taxonômicos gerais. Esses autores desenvolveram e testaram nove ensaios de qPCR para quantificar a abundância dos grupos dominantes de bactérias e fungos encontrados no ambiente do solo. Usando uma abordagem similar, Rousk et al. (2010), utilizaram a qPCR para determinar a abundância relativa de bactérias e fungos em solos com variação de pH. Li et al. (2011) estudaram a diversidade de comunidades bacterianas e fúngicas no processo de fermentação por meio de métodos moleculares. A diversidade bacteriana foi analisada através do sequenciamento de biblioteca de clones de 16S DNAr e a diversidade fúngica foi analisada através do pirosequenciamento da região do ITS1. A técnica de qPCR foi utilizada para a comparação da quantidade de bactérias e fungos durante o processo de fermentação.

2.1.3.4 Pirosequenciamento

Atualmente, quando o tema é sequenciamento, não se pode deixar de comentar sobre as metodologias de sequenciamento em larga escala. Essas novas tecnologias de sequenciamento, denominadas de tecnologias de sequenciamento de nova geração, começaram a ser comercializadas em 2005 e estão evoluindo rapidamente. Todas essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida. Dentre as novas plataformas de sequenciamento, duas já possuem ampla utilização em todo o mundo: a plataforma 454 FLX da Roche e a Solexa da Illumina. Essas novas plataformas possuem como características comuns um poder de gerar informação muitas vezes maior que o sequenciamento de Sanger, com uma grande economia de tempo e custo por base para o sequenciamento (CARVALHO et al., 2010). Dentre estas, a mais conhecida e utilizada até o presente momento é o pirosequenciamento, ou o sistema 454, que quebrou os limites dos estudos de diversidade microbiana em amostras ambientais. Essa técnica foi a primeira plataforma de sequenciamento de nova geração a ser comercializada.

A plataforma 454 realiza o sequenciamento baseado no pirosequenciamento (RONAGHI et al., 1998). A leitura da sequência nesse sistema é realizada a partir de uma combinação de reações enzimáticas que se inicia com a liberação de um pirofosfato, oriundo da adição de um desoxinucleotídeo à cadeia. Em seguida, esse pirofosfato é convertido para ATP, produzindo um sinal de luz capturado por uma câmera acoplada ao sistema. A biblioteca de DNA da amostra é ligada a adaptadores nas extremidades 3' e 5' dos fragmentos amostrados (MARGULIES et al., 2005). Nesse tipo de análise, a placa de sequenciamento é

dividida em 1,6 milhões de poços e quando ela é inserida junto ao sistema óptico de leitura no equipamento os reagentes e as soluções de sequenciamento são distribuídos por toda a placa a cada ciclo para obtenção do sequenciamento paralelo dos 1,6 milhões de poços. O sequenciamento é realizado em ciclos, e a cada ciclo um tipo determinado de nucleotídeo é adicionado à reação. Se o nucleotídeo adicionado for incorporado à sequência em síntese, um sinal de luz é emitido, sendo a intensidade desse sinal um reflexo do número de nucleotídeos desse tipo específico que foram sucessivamente incorporados na molécula. Como o nucleotídeo que é adicionado a cada ciclo é conhecido, o sinal de luz emitido pode ser diretamente utilizado como informação de sequência (RONAGHI, 2001).

Com relação às demais tecnologias de sequenciamento da segunda geração, a plataforma 454 é a que produz as maiores leituras e por isso tem sido mais utilizada, inclusive para o sequenciamento de genomas eucariotos. Genomas pequenos, como os de bactérias e de alguns eucariotos, podem ser facilmente montados usando a plataforma 454 (WICKER et al., 2009).

Esta tecnologia permite a obtenção de mega bases (1.000.000 de bases) sequenciadas em poucas horas. As primeiras versões dos equipamentos de pirosequenciamento eram criticadas pelo pequeno tamanho das sequências geradas. Porém, as novas plataformas para aplicação de tal tecnologia permitem a obtenção de aproximadamente 300.000 sequências com tamanho médio entre 300 e 400 pares de bases cada, em 5 horas. Tal tecnologia vem sendo utilizada no estudo de comunidades microbianas de diferentes ambientes. A diversidade bacteriana encontrada no fundo dos mares foi analisada em distintas profundidades (SOGIN et al., 2006), de maneira similar àquelas presentes em distintos solos em várias regiões do planeta (ROESCH et al., 2007). Ambos os estudos mostraram a grande diversidade bacteriana presente em tais ecossistemas, e concluíram que mesmo com 30.000 sequências analisadas, não foi possível amostrar toda a diversidade presente nestes ambientes. Adicionalmente, os autores mostraram que existem populações abundantes no ecossistema, mas que a grande diversidade é representada por populações que ocorrem em menor intensidade. Este grupo recebeu o nome de ‘cauda da biosfera rara’ (*rare biosphere tail*) no gráfico de distribuição e abundância de espécies presentes em determinada amostra (SOGIN et al., 2006).

Recentes estimativas sobre o número de espécies microbianas em um grama de solo têm recebido muita atenção. Tais estimativas são de grande interesse, pois o solo é capaz de abrigar as mais diversas populações de micro-organismos que qualquer ambiente na terra. Para se ter uma idéia, o número de potenciais microhabitats espaciais dentro de uma pequena

amostra de solo é extraordinário. Vale ressaltar que qualquer variação temporal dos fatores físico-químicas de solos, tais como temperatura, umidade e nutrientes dentro de cada um desses microhabitats espaciais aumenta ainda mais a diversidade de nichos disponíveis para apoiar as populações microbianas (ROESCH et al., 2007).

A tecnologia 454 foi introduzida nos estudos de ecologia microbiana como uma nova abordagem que é capaz de revelar a enorme diversidade taxonômica nas comunidades microbianas existentes graças à alta capacidade de resolução desse tipo de sequenciamento (YING AND JONG, 2008; SOGIN et al., 2006; BINLADEN et al., 2007; TEIXEIRA, et al., 2010). Tal abordagem é muito útil para ampliar nosso conhecimento sobre as comunidades microbianas que abundam em ecossistemas de mangue, e para avaliar os efeitos do derramamento de óleo sobre estes.

Santos, et al. (2011), utilizaram a metodologia de pirosequenciamento de microcosmos para avaliar a estrutura e a diversidade de comunidades bacterianas em sedimentos de mangue, demonstrando o quanto tais comunidades podem ser sensíveis ou até mesmo estimuladas quando receberam óleo combustível.

Monchy et al. (2011) avaliaram através do pirosequenciamento algumas regiões hipervariáveis do gene rRNA SSU a partir de amostras selecionadas. Este método, já foi utilizado com sucesso por Sogin et al. (2006) e Huse et al. (2008) para a exploração da composição das comunidades bacterianas e fúngicas do fundo do mar, e esses autores justificam a rentabilidade do método principalmente por eliminar-se a etapa de clonagem, permitindo assim, a maximização do número de organismos amostrados em uma análise.

Para avaliar a diversidade de fungos em sedimentos de manguezais, Arfi et al. (2012) também utilizou a tecnologia do 454 das regiões de ITS do DNAr. Outros exemplos desse tipo de estudo são aqueles conduzidos por Buée e colaboradores (2009), que estudaram seis diferentes solos florestais da região de Burgundy na França, através de pirosequenciamento da região ITS do rDNA, e identificaram entre 600 e 1.000 UTOs em cada amostra de solo florestal, identificando entre 249 e 409 grupos taxonômicos. A maioria das UTOs (81%) encontradas foram relacionadas aos filos Basidiomycota e Ascomycota, sendo a maioria das sequências referentes à *Ceratobasidium* sp., *Cryptococcus podzolicus*, *Lactarius* sp. e *Scleroderma* sp.

Lim e colaboradores (2010) ao avaliarem a diversidade de fungos de solos de três ilhas na Coreia e China através de pirosequenciamento da região do gene do rRNA 18S, obtiveram 372 táxons a partir de 9698 sequências analisadas. A maioria das sequências

analisadas foi relacionada também aos filos Basidiomycota e Ascomycota, ocorrendo a predominância desse último.

2.1.4 Metagenômica

Com a evolução da biologia molecular houve um avanço nos estudos da microbiologia ambiental e da ecologia do solo. O surgimento de metodologias moleculares independentes do cultivo microbiano, como extração de ácidos nucléicos, amplificação por PCR, clonagem e sequenciamento, têm sido otimizadas e adaptadas para superar as limitações impostas pela abordagem clássica. Dentro deste contexto surgiu a metagenômica, uma estratégia alternativa para este problema. Este termo (metagenoma) foi cunhado em 1998 para representar os genomas da microbiota total encontrada em uma comunidade (HANDELSMAN et al., 1998). Esta estratégia oferece uma alternativa para a exploração do potencial metabólico de microrganismos que não são recuperados por métodos baseados em cultivo.

Com o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento massivo, alterações surgiram neste conceito, sendo hoje possível acessar largamente a informação genética contida em amostras de solo excluindo-se a etapa de clonagem. Este tipo de análise é bastante atrativa pela possibilidade de descrever de maneira representativa os genes funcionais e filogenéticos conjuntamente, colocando estes enfoques na mesma análise, o que permite a melhor inferência sobre a funcionalidade microbiana dos solos. Um exemplo desta aplicação buscou descrever a diversidade filogenética e funcional da comunidade microbiana presente em amostras de gelo glacial (SIMON et al., 2009). Os autores analisaram um total de 1.076.539 sequências, que quando agrupados representaram 239,7Mb (equivalente a aproximadamente 50 genomas bacterianos). Os resultados demonstraram parte do metabolismo microbiano neste ambiente, com destaque para a presença de genes de adaptação à psicrofilia (SIMON et al., 2009). Atualmente, existe na Europa um consórcio de laboratórios empenhados a utilizar tal metodologia na completa descrição do material genético microbiano contido em um grama de solo, numa iniciativa chamada de TerraGenome (<http://www.terragenome.org/>) (VOGEL et al., 2009). Com isto, espera-se estabelecer parâmetros e entender melhor as interações microbianas que regem tal ecossistema. Devido à inovação desta técnica, existe também uma ampla discussão em sua eficiência em representar fielmente a diversidade microbiana do ambiente a ser analisado (HOFF et al., 2009). Alguns trabalhos mostram que os problemas levantados com relação a isso, como o tamanho dos

fragmentos gerados, podem ser contornados por metodologias novas de montagem de fragmentos e anotação das regiões de DNA obtidas (LIU et al., 2007).

Estudos metagenômicos têm sido realizados em diversos ecossistemas como em biorreatores, ambientes naturais, águas marinhas (DELONG et al., 2006; KONSTANTINIDIS et al., 2009; SHI et al., 2010; QUAISER et al., 2011), solos intactos e agrícola (Tringe et al., 2005; De Angelis et al., 2010) e ambientes extremos (SIMON et al., 2009; BODAKER et al., 2010; INSKEEP et al., 2010; AMARAL-ZETTLER et al., 2011).

Andreote et. al (2012) apresentaram uma descrição robusta dos micro-organismos encontrados em diferentes áreas de mangue no Estado de São Paulo, Brasil, baseadas em análise metagenômica direta. Além da descrição dos micro-organismos, eles também apresentaram os processos metabólicos preferenciais que pode estar ocorrendo neste ecossistema, dando base ao funcionamento dos ciclos biogeoquímicos, e assegurando a ciclagem de nutrientes neste ambiente.

2.1.5 Biodegradação e biorremediação de hidrocarbonetos em manguezais

A palavra petróleo significa ‘óleo da pedra’, por ser um composto encontrado normalmente impregnado em determinadas rochas porosas, dispostas em camadas geológicas sedimentares. Este material é uma mistura de hidrocarbonetos que se formou na Terra há milhões de anos, a partir da decomposição de pequenos animais marinhos, plâncton e vegetação típica de regiões alagadiças. Hoje, tal composto é encontrado junto ao gás de petróleo, formando bolsões entre rochas impermeáveis ou impregnando rochas de origem sedimentar. O petróleo foi um dos primeiros recursos naturais que nossos antepassados aprenderam a usar. No entanto, sua utilização mais intensa se iniciou efetivamente ao redor de 1.847, quando um comerciante de Pittsburgh, na Pensilvânia (EUA), começou a engarrafar e vender petróleo resultante de vazamentos naturais (*oil sleeps*) para ser utilizado como lubrificante. Em 1.852, um químico canadense descobriu que o aquecimento e a destilação do petróleo produzia querosene, que podia ser utilizado em lâmpadas. Sete anos mais tarde, em Titusville, Pensilvânia (EUA), foi perfurado o primeiro poço de petróleo, com a profundidade de 21,2 metros, do qual se obteve mais de 35 barris de petróleo (CORRÊA, 2003; OLIVEIRA, 2008).

A composição química do petróleo varia de acordo com a sua origem, mas é essencialmente formado de carbono e hidrogênio (90% dos óleos crus), com quantidades relativamente pequenas de compostos orgânicos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e organometálicos. Predominam dentre tais componentes os hidrocarbonetos acíclicos saturados

(alcanos), de cadeia normal e ramificada, bem como os cíclicos, também de cadeia normal ou ramificada (cicloalcanos) e os aromáticos (OLIVEIRA, 2008).

Recentemente, práticas antrópicas, como extração, refino, transporte derramamentos e uso do petróleo e também processos de combustão incompleta de combustíveis fósseis tem causado um grande acúmulo de hidrocarbonetos no meio ambiente, sendo estimados milhões de toneladas por ano (SMITHS et al., 2002; XU et al., 2008; CHANG et al. 2008) e tornando-se um problema grave em todo o mundo (KUBOTA et al., 2008). Em ambientes de sedimento marinho e de manguezais esses contaminantes são comumente encontrados em concentrações bastante elevadas (YUN et al. 2008; MARGESIN et al., 2003; LE BORGNE et al., 2008).

Pelo fato dos manguezais serem ecossistemas costeiros, eles estão entre os principais locais onde convergem derrames de petróleo e passam a funcionar como um depósito desse contaminante, pois a circulação de marés favorece a deposição de petróleo em sistemas de raízes aéreas e sedimentos e com isso causa sérios danos aos manguezais (ZHU et al., 2001). Por exemplo, em janeiro de 2000, na Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, uma ruptura de gasoduto causou um derramamento de petróleo de 1,3 milhões de toneladas, contaminando grandes áreas de praias e manguezais (BRITO et al. 2009). Este evento causou uma grave degradação na floresta perto de manguezais da foz do Rio Suruí.

A limpeza destes locais poluídos pode ser realizada por micro-organismos degradadores de petróleo, processo conhecido como biorremediação, o que constitui uma alternativa biológica para a descontaminação de locais impactados com petróleo (VAN HAMME et al., 2003) A biorremediação é baseada na habilidade metabólica de micro-organismos para transformar ou mineralizar contaminantes orgânicos em substâncias menos nocivas, as quais são logo integradas aos ciclos biogeoquímicos. A intensidade da biodegradação é influenciada por vários fatores, tais como nutrientes, oxigênio, pH, composição, concentração e biodisponibilidade dos contaminantes, assim como pelas características físicas e químicas do ambiente contaminado (MARGESIN & SCHINNER et al., 2001). O princípio da biorremediação baseia-se na utilização de populações microbianas que possuem a capacidade para modificar ou decompor determinados poluentes. Essa técnica é explorada para que haja uma possível transformação dos contaminantes em produtos finais menos tóxicos (ou até a mineralização completa), que são então integrados naturalmente nos ciclos biogeoquímicos (ALEXANDER, 1994; ATLAS, 1994; CUNHA; LEITE, 2000).

Quando se fala em degradação de hidrocarbonetos complexos, como no caso o petróleo em ambientes naturais, é importante ressaltar que as comunidades microbianas são

eficazes por possuírem uma alta versatilidade metabólica, realizando a biotransformação de vários contaminantes e permitindo assim a biorremediação desses locais impactados pelo óleo (KORDA et al. 1997; CRÁPEZ et al. 2002; ALEXANDER, 1994). A complexidade dos processos metabólicos necessários para degradar hidrocarbonetos sugere que nenhum micro-organismo em particular degrada completamente o petróleo; é provável que a degradação de tal contaminante ocorra de forma mais eficiente quando realizado por consórcios microbianos (bactérias e fungos) (SANTOS et al., 2011).

A maior motivação dos estudos que hoje focam na biodegradação de hidrocarbonetos é a busca por micro-organismos versáteis, capazes de degradar eficientemente uma grande variedade de poluentes com um baixo custo operacional. No entanto, tem sido demonstrado que alguns hidrocarbonetos são altamente recalcitrantes, o que limita sua degradação pela atividade microbiana, ou ainda, ocorre que sua degradação gera compostos tanto ou mais tóxicos às moléculas inicialmente presentes no solo (ESTEVENUNEZ et al., 2001). As vias metabólicas responsáveis pela degradação de muitos poluentes não são ainda totalmente conhecidas, principalmente porque muitos organismos que participam desta degradação não são analisados por métodos dependentes do cultivo microbiano. Dessa forma, os mesmos organismos são sempre isolados, resultando na descrição repetida de etapas únicas do processo de degradação que ocorre no ambiente (VASCONCELOS et. al., 2010).

Bactérias e fungos são capazes de degradar e transformar moléculas orgânicas ambientais. Dessa forma, resta saber em quais características ambientais, ou circunstâncias, os fungos podem ser vantajosos para um programa de biorremediação. Obviamente, a primeira vantagem seria sua aplicação na degradação de compostos não degradáveis por bactérias. Além desta vantagem, pode-se pensar em, por exemplo, em casos onde o componente a ser degradado possui características estruturais raras, apresenta baixa disponibilidade, possui pouca energia, ou ocorre em baixas concentrações (JUNGHANNS, C. et.al., 2005; CABANA, H. et.al., 2007; HATA, T., et. al., 2010).

Muitas espécies de fungos com a capacidade para utilizar os hidrocarbonetos tem sido estudadas (MANCERA-LÓPEZ et al., 2008). Alguns fungos filamentosos, principalmente os afiliados ao filo dos basidiomicetos (do grupo dos *white-rot-fungi*) têm mostrado eficiência em remover os hidrocarbonetos, sendo estes mais competente que as bactérias. Os hidrocarbonetos descritos como suscetíveis à degradação por fungos são: naftaleno, fenantreno, antraceno, pireno, benzo[a]pireno, fluoreno, dibenzotiofeno, catecol,

benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno e benzo[k]-fluoranteno (CERNIGLIA, 1997).

Em se tratando de fungos ligninolíticos, que também apresentam a capacidade de transformar as moléculas de hidrocarbonetos, esta ação se deve a presença das enzimas lignina peroxidase, peroxidases dependentes de manganês e de lacases. Os basidiomicetos que degradam lignina, normalmente não assimilam esses compostos como única fonte de carbono, e exigem substâncias como a glicose para efetuar a degradação por meio de cometabolismo (RI-HE PENG et. al., 2008). As enzimas usadas para tal processo não são específicas e, por isso, podem oxidar uma ampla variedade de compostos orgânicos (MESTER e TIEN, 2000; JHONSEN et al., 2005; ANASTASI et al., 2008). Dentre tais fungos, a espécie *Phanerochaete chrysosporium* tem recebido uma posição de destaque, juntamente com espécies do gênero *Cunninghamella*, mais especificamente a espécie *C. elegans*, descrita com grande capacidade de degradar vários hidrocarbonetos (CERNIGLIA e GIBSON, 1979; JUHASZ e NAIDU, 2000).

Os fungos, tanto sozinhos como em colaboração com bactérias e plantas, dispõem de muitos sistemas usados biotecnologicamente para remediar poluentes do solo, ar e água. No entanto, até o presente momento, a biorremediação baseada na ação de fungos não é uma história de sucesso. Isso se deve a comum escolha das bactérias para o desenvolvimento desta tecnologia, principalmente devido às menores exigências das bactérias para seu funcionamento em ambientes poluídos. Assim sendo, o potencial uso dos fungos na biorremediação está ainda para ser explorado, uma vez que estes organismos são conhecidamente possuidores dos metabolismos desejados para este propósito. (HARMS, et.al., 2011).

A degradação do óleo em sedimento de manguezais pode ser muito mais lenta que em outros locais; pois o processo de atenuação natural sem a utilização anterior de processos químicos e físicos depende de vários fatores, podendo levar até 15 anos após grandes derramamentos de petróleo (CUYPERS, 2001; ZHU et al. 2001; YANG et al. 2009; NOAA, 2002). Normalmente, quando o petróleo entra em um manguezal, as opções de limpeza são químicas, físicas e biológicas, tais como: i) remoção manual de óleo acumulado, ii) utilização de material absorvente, iii) bombeamento de óleo preso nas depressões e canais, iv) lavagem do sedimento e nas superfícies da vegetação (utilizando jatos de água de baixa pressão), v) utilização de dispersantes e vi) biorremediação (IPIECA 1993; NOAA 2002). No entanto, muitos dos métodos mencionados acima se tornam um problema quando aplicados

para manguezais, provocando efeitos secundários que, quando adicionados ao impacto do óleo, pode ser mais prejudicial para o ambiente. (SANTOS et al., 2011).

Acredita-se que a biodegradação microbiana é um dos os principais processos naturais utilizados para reduzir a concentração de hidrocarbonetos em sedimentos contaminados (HUGHES et al. 1997). Vários grupos têm relatado estudos que incidem sobre a distribuição e / ou diversidade de micro-organismos no mangue, como bem como a aplicação de técnicas de biorremediação nestes ambientes, especialmente os estudos realizados “*in vitro*” (PEIXOTO et al., 2009; SANTOS et al., 2011).

O potencial de aplicação de técnicas de biorremediação em manguezais contaminados por petróleo tem foi estudada no continente australiano (BURNS et al. 2000; DUKE et al., 2000, RAMSAY et al., 2000), na África (ODOKUMA; DICKSON, 2003), China (KE et al., 2003; GUO et al., 2005; YU et al., 2005a; LUAN et al., 2006) e Brasil (BRITO et al. 2009, SANTOS et al., 2011).

A biorremediação em manguezais pode ser realizada de várias maneiras, dependendo dos diferentes aspectos das condições ambientais, as ferramentas disponíveis e os objetivos principais. Para uma estratégia do processo de bioaugmentação por exemplo, os micro-organismos potencialmente degradadores de hidrocarbonetos de petróleo selecionados do próprio ambiente são introduzidos no local, podendo também utilizar micro-organismos de outros locais ou estirpes geneticamente modificados, de acordo com as leis de uso de cada país (os micro-organismos da biota natural seria, em princípio, mais adequados, em comparação com os de outros locais ou micro-organismos geneticamente modificados porque a monitorização intensiva não seria necessária) (ATLAS, 1981; VOGEL, 1996; KORDA et al. 1997).

Ramsay et al. (2000) relataram um grande número de e uma diversidade ampla de PAH de degradação micro-organismos em sedimentos de manguezais da Austrália. Ke et al. (2003), realizaram um estudo de biorremediação de mangue contaminado com pireno demonstraram a remoção de 90% desse composto em 6 meses.

Peixoto et al. (2009), utilizaram um consórcio microbiano autóctone em ensaios de microcosmos de manguezais contaminados com 1% de diesel e notaram que a sobrevivência da planta *Laguncularia racemosa* aumentou em 35%.

Li et al. (2007) and Burns et al. (1999) destaque a necessidade de maximizar a permanência dos nutrientes aplicado no local contaminado para alcançar uma eficiente e remediação de baixo custo, especialmente em ambientes tais como os sedimentos de mangue, onde os nutrientes são muitas vezes limitada. Estudos sugerem que a degradação microbiana

de óleo em sedimentos de mangue é estimulada por adicionando fertilizantes inorgânicos (LEE et al. 1993; ODOKUMA; DICKSON 2003; YU et al. 2005a). No entanto, a eficácia desta estratégia varia de sedimento para sedimento e de contaminante para contaminante (BALBA et al. 1998).

Apesar dos aspectos sustentáveis e do baixo custo das técnicas de biorremediação, o conhecimento dos fatores relacionados às comunidades microbianas (incluindo a diversidade e função) com os locais contaminados são necessários para o êxito da abordagem (DESAI et al. 2010). Esse conhecimento nem sempre pode ser acessado por uma abordagem clássica, envolvendo a cultura dos micro-organismos relacionado a uma série de condições fisiológicas para promover o crescimento microbiano, visto que em geral as condições de cultura impõem uma certa pressão seletiva, impedindo o crescimento de muitos micro-organismos não cultiváveis (SANTOS et al., 2009).

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Manguezais e amostras avaliadas

No presente estudo foram avaliadas as comunidades fúngicas presentes em dois manguezais localizados na cidade de Bertioga (Estado de São Paulo) (Tabela 1), sendo um em estado natural (apenas tendo como agente de seleção a pressão antrópica devido à proximidade com a cidade) (nomeado de AntMgv), enquanto que o outro sofreu impacto causado por derramamento de 35 milhões de litros petróleo no ano de 1983, e a mata nativa apresenta-se ainda em regeneração (nomeado de OilMgv). Nos dois manguezais amostrados a água de inundação é composta por uma mistura entre água do mar e do Rio Iriri.

Tabela 1 - Localização geográfica dos manguezais amostrados no Estado de São Paulo

	Bertioga Contaminado (OilMgv)	Bertioga (AntMgv)
Latitude	23°53'49" S	23°54'06" S
Longitude	46°12'28" W	45°15'03" W

Em cada manguezal, um transecto foi determinado, com orientação do mar para o continente, delineando três sub-regiões, que são diferenciadas facilmente; uma primeira região próxima ao mar/rio, a segunda região no centro do manguezal, e a terceira numa área próxima ao continente, chamada de restinga (Figura 1). A composição das amostras analisadas foi realizada com três repetições de cada ponto em cada manguezal, totalizando um

total de 18 amostras (2 manguezais x 3 localidades x 3 repetições). Cada amostra constituiu-se de uma quantidade de sedimento obtida por amostrador de 30 cm de comprimento, com 7 cm de diâmetro, que foi introduzido no sedimento dos manguezais e retirado contendo o material a ser analisado.

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

Vale ressaltar que as localidades amostradas variam de acordo com a ocorrência de espécies arbóreas. Em relação às diferenças entre manguezais, os pontos 2 e 3 do manguezal de Bertioiga com contaminação são aqueles com maior impacto do derramamento do óleo (denominado OilMgv). O ponto 1, por estar separado dos demais fisicamente, por um pequeno córrego que corta tal manguezal, tem menor efeito da contaminação, e assemelha-se morfológicamente aos pontos de análise do manguezal de Bertioiga sem contaminação, o que leva este ponto a receber uma denominação diferencial (NOilMgv). Análises físico-químicas das amostras de todos os pontos foram realizadas com a finalidade de determinar as diferenças encontradas nos locais de cada coleta. Estas análises

foram realizadas Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP, Piracicaba), de acordo com a metodologia descrita por Van Raij et al. (2001) (Tabela 2).

Tabela 2 - Análises físico-químicas dos pontos avaliados dentro dos dois manguezais amostrados

Análise	Bertioga Contaminado			Bertioga		
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
Composição Física						
areia:silte:argila (%)	34:60:6	69:26:5	335:50:15	71:24:5	59:36:5	57:38:5
Umidade	65,16	69,66	48,26	73,97	78,39	75,82
condutividade (mS)	8,98	12,32	10,68	9,42	12,85	9,82
Dados Químicos						
pH	6,9	6,8	6,4	7,1	6,8	6,9
matéria orgânica (%)	10,86	12,89	10,89	10,28	9,89	11,43
nitrogênio (N) (%)	0,13	0,45	0,31	0,29	0,26	0,34
fósforo (P) (%)	0,13	0,11	0,19	0,07	0,07	0,12
potássio (K) (%)	0,09	0,08	0,20	0,08	0,07	0,08
cálcio (Ca) (%)	0,27	0,31	0,33	0,24	0,19	0,23
magnésio (Mg) (%)	0,20	0,23	0,34	0,19	0,17	0,19
enxofre (S) (%)	0,31	0,36	0,32	0,24	0,26	0,20
sódio (Na) (mg/kg)	5.327	8.092	9.503	4.770	4.400	4.947

2.2.2 Extração de DNA das amostras de sedimento

A partir de cada uma das amostras de sedimento, o DNA foi extraído com o kit *Power Soil DNA Isolation kit* (MoBio, EUA) e após a extração, a integridade e a qualidade dos DNAs obtidos foram verificadas em eletroforese em gel de agarose 1% (w/v), seguida da coloração em brometo de etídeo e visualização em luz ultravioleta.

2.2.3 Quantificação da comunidade fúngica através da técnica de PCR em tempo real (qPCR)

As reações foram realizadas no equipamento ABI Prism 7300 Cyclyer (Applied Biosystems, Alemanha), utilizando o sistema SYBR Green I. A especificidade dos produtos de amplificação foi confirmada pela análise da curva de *melting* e do tamanho dos fragmentos de amplificação, checados em um gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio.

As reações de qPCR foram realizadas com os *primers* 5.8S (5'- CGC TGC GTT CTT CAT CG- 3') e ITS1f (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3') (FIERER et al., 2005), que geram um fragmento de aproximadamente 300 bp. Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas em volume de 25 µl contendo 12,5 µl of ABsolute qPCR Master Mix (ABgene), 1,25 µl de cada *primer* (10 µM; Invitrogen), 2,5 µl albumina bovina (10 mg ml⁻¹; Invitrogen). As condições das amplificações foram de 15 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 53°C por 30 s até a temperatura de anelamento, e 72°C por 1 min. Este sistema revelou uma eficiência de 0,85, um valor de R² para a curva padrão de 0,99, e um limite de detecção de 100 cópias da região alvo.

2.2.4 Análise das comunidades fúngicas do sedimento de manguezais por meio de DGGE

Os perfis da composição total da comunidade de fungos encontrados nas amostras de solos de manguezais foram determinados por meio da aplicação da técnica de DGGE. Na técnica de PCR-DGGE o DNA extraído diretamente da amostra ambiental foi utilizado para amplificação e posterior separação dos *amplicons* em gel gradiente desnaturante.

Primeiramente foi realizada uma PCR contendo 2 µl da amostra de DNA (aproximadamente 50ng de DNA) com os *primers* EF4 (GGA AGG GRT GTA TTT ATT AG) e ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) (ANDERSON et al., 2003). Os ciclos para amplificação foram: desnaturação inicial de 5 minutos à 94°C, seguida de 34 ciclos de 30 segundos à 94°C, 30 segundos à 55°C, 1 minuto e 30 segundos à 72°C e uma extensão final de 5 minutos à 72°C. O produto da primeira amplificação foi utilizado como DNA molde na segunda reação de PCR para amplificação com os *primers* para DGGE. Estas reações foram realizadas em volume de 25 µl com os *primers* ITS1 F (grampo de GC) (CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCT TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA) e ITS2 (GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC), também de acordo com Anderson et al. (2003). Os ciclos para amplificação foram: desnaturação inicial de 5 minutos à 94°C, seguida de 34 ciclos de 30 segundos à 94°C, 30 segundos à 55°C, 30 segundos à 72°C e uma extensão final de 5 minutos à 72°C.

A análise em DGGE foi realizada pelo aparelho phorU2 system (Ingeny, Holanda). O produto de amplificação da segunda reação foi aplicado em gel de poliacrilamida 8% (w/v) (8 µl) em tampão TAE 0,5M. O gel foi preparado com gradiente desnaturante variando entre 30 a 80% (onde 100% significa a concentração de 7M de uréia e 40 % de

formamida). Os géis foram submetidos por 16 horas a 175 V à temperatura de 60°C e posteriormente corado e fotografado.

Os perfis de bandas das comunidades fúngicas foram convertidos em uma matriz de presença e ausência, dando base para a análise de correspondência (CA), realizada no programa Canoco 4.5.

2.2.5 Construção e análise de bibliotecas de clones da região intergênica ribossomal fúngica (ITS)

Esta análise foi realizada com base na divisão dos perfis obtidos na análise de DGGE e nos dados de quantificação por PCR em tempo real. Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos foram construídas três bibliotecas de clones, dividindo os dois manguezais estudados a partir das repetições dos pontos de amostragem, como descrito na figura 2. A área nomeada de NOilMgv é composta pelo ponto 1 dentro do manguezal contaminado e trata-se de uma área com baixo impacto em relação ao derramamento de óleo. A segunda área é composta pelos outros pontos deste manguezal (pontos 2 e 3) e denominada OilMgv (área a qual, existe um grande impacto devido ao derramamento). Já a terceira área é composta pelas três áreas amostradas no manguezal não contaminado e recebe o nome de AntMgv.

Figura 2 - Esquema da junção dos pontos amostrados para a montagem das bibliotecas de clones da região ITS de fungos

Para tanto, primeiramente os DNAs extraídos foram submetidos à amplificação com *primers* específicos para o gene de interesse, seguindo metodologia descrita no item anterior, com uma única diferença na segunda amplificação, onde ao invés da utilização do *primer* ITS1F-GC (com grampo), foi utilizado o mesmo *primer* sem o grampo de GC (apropriado para análise em DGGE). Os produtos desta segunda amplificação foram analisados e quantificados em eletroforese em gel de agarose, seguido de coloração em brometo de etídeo e observação em luz ultravioleta. Posteriormente, os produtos de amplificação foram purificados e clonados em plasmídeos de *Escherichia coli* utilizando o kit

pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, EUA), com a transformação baseada em eletroporação, seguindo as instruções do fabricante. As colônias transformantes foram selecionadas pela coloração branca-azul, em placas contendo meio LB ágar (composto por triptona, extrato de levedura, NaCl e ágar), X-gal e ampicilina. Colônias que apresentaram coloração branca foram selecionadas e crescidas em 1 mL de meio LB líquido acrescido de ampicilina em placas de 96 poços de 2 mL cada para detecção do inserto. A presença deste foi confirmada por meio de amplificação com o *primer* M13F e M13R e posteriormente feita a purificação e precipitação para o sequenciamento, realizado por terceirização junto ao Grupo de Estudos do Genoma Humano (IB, USP).

2.2.6 Análise das sequências obtidas

Usando a metodologia citada acima, 180 clones contendo o inserto de ITS foram obtidos. A qualidade das sequências foi verificada e as sequências do vetor nelas presentes foram removidas com o programa Lucy, disponível no *pipeline* do *Ribosomal Data Project*.

As sequências de qualidade e já limpas foram comparadas com as disponíveis no banco de dados do GenBank (nr/nt) por meio da análise pelo BlastN (megablast). Com isto, foram identificados os principais grupos fúngicos presentes nas amostras avaliadas, e sequências representantes de tais grupos foram selecionadas para uma análise filogenética das sequências obtidas no presente estudo juntamente com as já anteriormente descritas. Tais análises foram realizadas no programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011), gerando as matrizes de distância com o parâmetro Kimura-2, e agrupando as sequências por *Neighbor-Joining* (SAITOU E NEI, 1987). Para testar os agrupamentos obtidos, testes de *bootstrap* foram realizados com 1.000 repetições, sendo os valores maiores de 40 sempre mostrados nos agrupamentos.

Adicionalmente, o programa MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009) foi utilizado para fazer as análises no intuito de identificar as Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOS), formando grupos de sequências com 95% de similaridade. Estes grupos foram considerados para gerar as curvas de rarefação, e a estimativa da cobertura ecológica de *Good*.

As sequências que foram obtidas nesse estudo foram depositadas no *GenBank* sob os códigos de acesso JQ038242 a JQ038371.

2.2.7 Análise da comunidade fúngica por pirosequenciamento da região ITS

O sequenciamento das amostras por pirosequenciamento foi feito através de terceirização do serviço (Macrogen, Coreia do Sul). Nesta análise foram avaliadas duas repetições de cada uma das três áreas: ponto 1 do manguezal contaminado (NOilMgv), pontos 2 e 3 do manguezal contaminado (OilMgv), e todos os pontos do manguezal não contaminado (AntMgv) (Figura 1). Vale ressaltar que essas áreas foram determinadas com base em uma série de análises realizadas pelo grupo de trabalho, como perfis de DGGE tanto de fungos, quanto de bactérias e arqueias. Foi esta a divisão usada na análise de tais amostras por metagenômica (ANDREOTE et al., 2012)

Dessa forma, os DNAs extraídos foram amplificados com os primers ITS1F e ITS2, flanqueando assim a região ITS. Nos *primers* foram adicionados adaptadores A e B, conforme orientação do manual do fabricante do equipamento (Roche, EUA). Adicionalmente, o *primer forward* usado para cada amostra recebeu uma *tag* de identificação composta de 6 a 8 bases, que serviu para identificar a origem (cada local amostrado recebeu uma *tag* diferente) de cada uma das sequências obtidas.

Os grupos de sequências foram separados de acordo com as *tags*, e cada um deles foi avaliado quanto a sua qualidade por meio do *Pyrosequencing Pipeline do Ribosomal Database Project* (RDP). As sequências de alta qualidade foram então submetidas para análise de similaridade no banco de dados MG-RAST, onde foram comparadas, e classificadas dentro de grupos taxonômicos, permitindo a observação das frequências relativas dos grupos, e dando suporte a análise da composição diferencial de tais comunidades, feita por meio de *nonmetric multidimensional scaling* (NMDS).

Com base na boa repetibilidade das duas amostras analisadas de cada uma das áreas, as repetições foram agrupadas para uma análise independente da taxonomia, feita por meio da geração de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) e aplicação das ferramentas disponíveis no *software* MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009).

Todas as sequências foram agrupadas e alinhadas por meio do programa MAFFT (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::mafft>), sendo este alinhamento usado na geração da matriz de distância, usada posteriormente para a obtenção dos índices de riqueza (Chao1), diversidade (1/Simpson) e de cobertura (ICE).

O índice de Chao1 usa o número de UTOs com uma ou duas sequências para estimar o número de espécies faltantes, pois de acordo com o autor esta informação está presente nestas UTOs (CHAO, 1984). Para a estimativa de diversidade de espécies presentes nas comunidades analisadas foi aplicado o índice de Shannon, que é um índice geral de

diversidade sensível a riqueza e a abundância relativa de espécies (ATLAS; BARTHA, 1998). Para a análise de suficiência amostral utilizou-se a metodologia descrita por Mullins e colaboradores (1995). A cobertura gerada com o número de sequências amostradas (C) é igual a $1-(n/N)$ onde n é o número de sequências que ocorreram apenas uma vez (sequências únicas) e N é o número total de sequências amostradas. Estes índices foram obtidos usando o *software* MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009).

Além destes índices, a análise no Mothur propiciou a análise de beta diversidade, determinando a ocorrência de UTOs compartilhadas e exclusivas para cada uma das áreas estudadas, o que é demonstrado pelo diagrama de Venn. Por fim, este programa foi usado para a seleção de sequências representativas de cada uma das UTOs, usadas na reconstrução filogenética.

2.2.8 Análise da comunidade eucariótica presente em sedimentos de manguezais por metagenômica descritiva

Esta etapa do trabalho teve como base os *datasets* metagenômicos gerados a partir das mesmas amostras analisadas. No entanto, para este tipo de inferência o DNA ambiental foi extraído e diretamente sequenciado por meio da metodologia de pirosequenciamento. Esta parte do trabalho foi desenvolvida por nosso grupo, e os principais resultados publicados recentemente (ANDREOTE et al., 2012).

Com o intuito de inferir sobre a diversidade de fungos e outros organismos eucarióticos nestas amostras, foi realizada uma análise com base em tais dados. Dentro da plataforma MG-RAST, cada um dos metagenomas foi analisado quanto a ocorrência dos grupos alvo, pedindo por uma análise das sequências por "*Best hit classification*", com base na anotação contra o *GenBank*, considerando um valor máximo de *E-value* de 1^{-5} , identidade mínima de 60%, e alinhamento mínimo de 15 bases. Com base nos resultados, uma visualização foi gerada pelo gráfico interativo Krona, onde as classificações ao nível de família foram usadas como nível máximo, e os diferentes filos foram coloridos diferencialmente.

2.3 Resultados e Discussão

A comunidade microbiana que habita o sistema solo é muito abundante e complexa, sendo na grande maioria das condições em que os solos ocorrem, longe de serem devidamente descritas e compreendidas. Sedimentos de manguezais constituem uma classe de solo com características particulares, onde bactérias, arqueias e fungos interagem entre si,

com plantas e animais específicos (HOLGUIN et al. 2001). Nesse trabalho é discutida a importância de se obter e adicionar informação em relação a descrição da comunidade fúngica nesse ambiente, uma vez que a maioria dos estudos focam em comunidades de bactérias e arqueias encontradas em sedimentos de manguezais (DIAS et al., 2010; DIAS et al., 2011; YAN et al., 2006; LIANG et al., 2007). Ainda, assumindo que fungos são descritos como um grupo de organismos menos responsivos do que bactérias à alteração de importantes parâmetros do solo, como o pH (ROUSKE et al 2010), uma vez que alterações em tais comunidades são encontradas, isso pode indicar a forte ocorrência de uma pressão de seleção, o que pode levar diretamente a nomeação de importantes grupos fúngicos para o funcionamento do ecossistema estudado. No presente estudo, esperou-se verificar alterações nas comunidades fúngicas em manguezais devido à contaminação por petróleo, o que pode indicar a participação de tais organismos no processo de biorremediação de manguezais contaminados. Algumas características dos fungos que podem dar a este grupo esta potencialidade são: a formação de extensas ramificações miceliais, a baixa especificidade de ação de seu arsenal enzimático extracelular e a independência de tais organismos para degradar compostos poluentes (HARMS et al., 2011).

Vale ressaltar também, que estudos focados no crescimento de fungos em condições anaeróbias são ainda poucos, mas segundo Takaya (2002), alguns ascomicetos e basidiomicetos possuem a capacidade de utilização de redução dissimilatória do nitrato para sustentar o crescimento anaeróbio, podendo assim, surgir uma possível explicação na capacidade que eles possuem para crescer em substratos com o mínimo (ou até mesmo sem) de oxigênio.

2.3.1 Quantificação de fungos em sedimentos de manguezais por qPCR

A aplicação da metodologia de PCR em tempo real permitiu quantificar as comunidades alvo nas amostras de sedimentos dos distintos manguezais analisados. Este sistema foi utilizado para quantificar o número de cópias da região ITS, usando este valor como referência para atribuir abundância às comunidades fúngicas. O tamanho das regiões amplificadas foi de 300 pb, e as regiões foram amplificadas com uma eficiência média de 85,5% e um valor de R^2 igual a 0,99. No que diz respeito ao número de cópias da região ITS que foram identificados nas amostras de sedimento de mangue, foi observada uma maior tendência na abundância de fungos nas amostras do manguezal contaminado (NOilMgv + OilMgv), em comparação com as amostras AntMgv (Figura 3). Em relação aos pontos 2 e 3 de OilMgv foram observados um maior número de cópias da região ITS em comparação com

todos os outros pontos da amostra ($p < 0,05$), onde é possível notar os valores de log de 9,18 e 8,53 por grama de sedimento. No ponto 1 do mesmo manguezal (NOilMgv), foram encontrados valores de log de 7,83. Em AntMgv, os valores foram semelhantes em todos os três regiões amostradas, consistentemente mais baixos do que o OilMgv, e o valor médio de log variou de 7,51 a 7,63 por grama de sedimento (Figura 3).

Figura 3 - Quantificação de cópias da região ITS fúngica em sedimentos de manguezais por meio de qPCR. Os valores indicam a média de três repetições biológicas, e as barras indicam o erro padrão de cada local amostrado

Estes resultados indicam que existe um aumento na abundância de fungos possivelmente relacionado com a história de contaminação com óleo em manguezais. Embora possa haver fatores que afetam direta ou indiretamente estas comunidades, estes resultados indicam que alguns membros das comunidades fúngicas são potencialmente adaptáveis ao petróleo e com isso, tornam-se mais abundantes nas áreas contaminadas. Tais dados fornecem uma excelente oportunidade para identificar e candidatar tais fungos para um possível processo de biorremediação de manguezais.

Comparando os valores que foram obtidos no estudo com os da literatura, pode-se dizer que há uma grande abundância de fungos em sedimentos de manguezais. A literatura mostra que nos solos, valores de aproximadamente 2.10^3 cópias deste fragmento por

grama são comumente encontrados (ROUSKE et al., 2010), enquanto que em solos alagados, como na rizosfera de arroz, este valor pode variar entre 104 e 105 cópias por grama de solo, dependendo do genótipo da planta (HUSSAIN et al., 2011). Isto torna os sedimentos de manguezais locais importantes para o estudo da comunidade fúngica devido a natural abundância de tais organismos, e indica fortemente sua adequação para a bioprospecção de fungos relacionados à biorremediação do petróleo, uma vez que a contaminação com tal poluente leva a um aumento na densidade populacional de tais organismos.

A baixa quantidade de fungos encontrados nos solos comparado com os níveis encontrados nos sedimentos de manguezais pode se justificar pela elevada abundância de matéria orgânica (açúcares e derivados) neste ambiente, e outras condições ambientais podem levar à presença de leveduras, que são possivelmente responsáveis por alguns dos processos fermentativos que ocorrem em tal nicho.

2.3.2 Análise da comunidade fúngica dos manguezais avaliados por meio de DGGE

Sabe-se que o DGGE é um método de *fingerprinting* que gera um padrão ou perfil da diversidade genética em uma comunidade microbiana, onde bandas diferentes (geralmente) correspondem a diferentes sequências, gerando uma análise de impressões digitais da amostra alvo (MUYZER et al. 1993). No presente estudo, foi utilizado o sistema de PCR-DGGE para destacar as diferenças entre as comunidades de fungos encontradas nos sedimentos dos dois manguezais amostrados. Os diferentes perfis de DGGE mostraram padrões complexos e uma grande abundância de bandas, o que evidencia a ocorrência de uma grande riqueza de fungos neste ambiente. Adicionalmente, as variações encontradas entre perfis de amostras distintas mostram sua responsividade às alterações ambientais, que atuam na estruturação de tal comunidade, modificando-a de forma qualitativa (presença de algumas bandas em amostras específicas), ou alterando a quantidade de organismos de cada grupo (variações na intensidade de bandas). Dentro dos perfis obtidos é possível observar grupos selecionados para cada manguezal, para cada região dentro de um mesmo manguezal, e bandas aleatórias, que ocorrem erráticamente em apenas uma das repetições de cada área (Figura 4a). No entanto, além da ocorrência de "errática" das bandas, a presença de bandas específicas entre áreas distintas foi observada, com uma observação especial para bandas que só foram encontrados em amostras coletadas no local contaminado com óleo (OilMgv). Estas bandas são indicadas na figura 4 (setas), e indicam a ocorrência exclusiva de grupos fúngicos em tais áreas, o que pode indicar seu papel na degradação deste tipo de contaminante. Dias et al. (2011) avaliaram as comunidades de *Archaea* nas mesmas amostras e observaram uma

separação dos perfis de bandas muito semelhantes entre as repetições. Isto pode sugerir que as comunidades fúngicas são estruturadas de uma forma mais complexa, o que levou a esta baixa repetibilidade.

Figura 4 - (a) Perfil de DGGE da comunidade fúngica nos sedimentos dos diferentes manguezais e pontos avaliados. M indica as linhas com marcador, e as bandas marcadas indicam a seleção pela contaminação por petróleo. A figura b indica a análise correspondência (CA) mostrando os três primeiros eixos, onde um valor total de 36,8% da variância é explicada

As alterações encontradas entre os manguezais amostrados neste estudo corrobora com dados anteriores (GOMES et al., 2008), indicando que diferentes tipos de contaminação podem levar a alterações nas comunidades microbianas presentes nos manguezais; e corroboram também com os dados apresentados anteriormente por Anderson et al. (2003), que descrevem a modificação na comunidade de fungos em um gradiente de transição entre dois ecossistemas. No caso do presente estudo, dentro de um manguezal ocorrem gradientes de condições físico-químicas e também de ocorrência de espécies arbóreas, que possivelmente pode levar a alteração gradual na comunidade fúngica neste ambiente. Myers et. al. (2001) descrevem que o metabolismo microbiano no solo é influenciado pela disponibilidade e tipo de substratos orgânicos, o que sugere que em ecossistemas como os manguezais, ocorre a produção diferencial de compostos orgânicos oriundo de diferentes composições na vegetação, e componentes oriundos de contaminação, o que pode promover um crescimento microbiano diferencial.

Ahn et al. (2006), Atlas et al. (1991) e Sanders et al. (1980) afirmaram em seus estudos que a estrutura da comunidade microbiana em locais onde houve contaminação por petróleo bruto contém componentes tóxicos que podem reduzir a diversidade de tal comunidade. Já Nyman (1999) disse que tal atividade é capaz de estimular a atividade metabólica e a abundância de micro-organismos resistentes. Observando tais afirmações, é interessante dizer que no presente estudo a comunidade fúngica varia de acordo com o nível de contaminação por petróleo em sedimentos de manguezais, e que alguns grupos fúngicos foram sensíveis à contaminação por petróleo. Isto pode então ser explicado pela sua resistência à toxicidade do poluente; ou pela sua capacidade de utilizar tais substratos para seu metabolismo. Além disso, as características particulares dos fungos, tais como sua capacidade de formar extensas redes miceliais, a baixa especificidade de suas enzimas catabólicas e sua capacidade de usar diferentes poluentes como substratos de crescimento, tornam estes organismos capazes de uma se adaptarem a diferentes locais com diferentes níveis de contaminação (HARMS et al. 2011; EMBLEY 2006).

Para uma melhor observação das diferenças e similaridades entre as amostras, as mesmas foram agrupadas numa análise de correspondência (CA), que confirmou as diferenças observadas nas comunidades de fungos entre cada um dos manguezais amostrados. Combinando a visualização dos primeiros três eixos (no total, 36,8% da variância explicada), os dois manguezais não foram capazes de ser totalmente diferenciados (Figura 4b). Isso é explicado devido à variabilidade no perfil de bandas entre as repetições. É possível observar um maior agrupamento das amostras oriundas dos pontos 2 e 3 do OilMgv, pontos de maior

impacto no manguezal contaminado, evidenciando a seleção feita pela presença do óleo neste manguezal. Comparando as separações observadas, com a análise feita para o grupo Archaea (DIAS et al., 2011), é possível verificar que os fungos mostram-se mais responsivos à contaminação por petróleo nos sedimentos dos manguezais.

A análise combinada dos resultados de qPCR e DGGE permite dividir os dois manguezais estudados em três áreas distintas em relação a composição da comunidade fúngica; a primeira composta pelo ponto 1 dentro do manguezal contaminado (NOilMgv - área com baixo impacto), a segunda composta pelos outros pontos deste manguezal (pontos 2 e 3 - OilMgv), e a terceira com composta pelas três áreas amostradas no manguezal AntMgv. O agrupamento de todas as amostras do AntMgv foi realizada porque o foco principal deste trabalho foi determinar o papel do derramamento de óleo e suas possíveis variações em um transecto de mangue. Dada essa divisão, as três áreas foram utilizadas para a construção e análise de bibliotecas e pirosequenciamento.

2.3.3 Análise da comunidade fúngica de sedimentos de manguezais por meio de bibliotecas de clones da região ITS

A filogenia dos grupos taxonômicos que compõem a comunidade fúngica avaliada foi inicialmente determinada por meio da análise de sequências de bibliotecas de clones, onde foram consideradas para análise um total de 180 sequências, sendo 77 originadas da área contaminada, mas considerada com menor contaminação (ponto 1 - NOilMgv), 48 sequências oriundas da área contaminada com petróleo (ponto 2 e 3 - OilMgv), e 55 sequências do manguezal AntMgv.

A primeira análise realizada com estes grupos de sequências revelou a frequência dos distintos grupos fúngicos nas amostras analisadas (Figura 5a), destacando cinco grupos como os mais frequentes ('uncultured Basidiomycota', 'uncultured fungi', *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp. e *Nigrospora* spp.), além de outros grupos, presentes em baixas frequências.

Estes grupos ocorrem em frequências diferentes nas áreas estudadas, reforçando a seleção e diferenciação da comunidade fúngica em cada local, como anteriormente sugerido pela análise de DGGE. Dentre tais grupos, a frequência de sequências afiliadas aos gêneros *Cladosporium* e *Epicoccum* foi similar nas três áreas estudadas; enquanto que sequências afiliadas a *Nigrospora* spp. foram apenas encontradas dentro do grupo originado da área com menor contaminação no manguezal contaminado (grupo NOilMgv) (Figura 5a). Esta observação indica a sensibilidade deste grupo a contaminação

com petróleo, o que pode sugerir o uso deste grupo como um bioindicador de contaminação em manguezais. Em relação à adaptação e possível uso na biorremediação, o grupo com maior frequência na área contaminada foi o composto por sequências afiliadas a 'uncultured Basidiomycota' (Figura 5a).

Dentre os grupos descritos no presente trabalho, alguns já foram relatados como habitantes de manguezais, como o gênero *Cladosporium*, previamente descrito como um fungo saprófito, encontrado em folhas oriundas de plantas típicas de manguezais (RAGHUKUMAR 2004), sendo suas enzimas essenciais para a degradação dos compostos de mais difícil degradação neste material orgânico. Um dos principais grupos de fungos relacionados com a degradação de compostos recalcitrantes é o chamado 'fungos de degradação branca', conhecidos por secretar enzimas extracelulares envolvidas na degradação de compostos que possuem anéis aromáticos em sua composição, como a lignina, e outros materiais encontrados no ambiente devido a contaminação, como a do petróleo (BARR et al., 1994; FIELD et al., 1992). Este grupo é bastante diverso taxonomicamente, englobando organismos afiliados aos dois maiores grupos de fungos: Ascomycota e Basidiomycota, o que permite a sugestão de que fungos encontrados em sedimentos de manguezais, e que são adaptados a conviver e degradar compostos do petróleo, podem ser novos membros deste grupo chamado de 'fungos de degradação branca'.

Figura 5 - Proporção de sequências de ITS de fungos afiliados aos distintos grupos taxonômicos nas três áreas de manguezais avaliadas (a), e análise de rarefação das bibliotecas (b), determinada por agrupamento das sequências com 95% de similaridade

Além da análise baseada em taxonomia, as curvas de rarefação também indicam a seleção feita pela presença do petróleo sobre a comunidade fúngica encontrada nos sedimentos de manguezais (Figura 5b). Nesta análise, a saturação está claramente mais próxima de ser alcançada para o grupo de sequências obtidas dos pontos 2 e 3 do manguezal contaminado (OilMgv); o que sugere que apenas os grupos mais adaptados sobrevivem a tal contaminação, podendo possivelmente, utilizar este substrato para sua ploriferação. Os

valores de cobertura ecológica corroboram esta afirmação, sendo encontrado o valor de 64,6% para a área de maior contaminação, enquanto que valores de cobertura de 54,5 e 40,0% foram encontrados para os grupos de sequências NOilMgv e AntMgv, respectivamente. Tais valores mostram que, apesar de não ter sido feita uma exaustiva amostragem da comunidade de fungos, uma grande fração de tal comunidade pôde ser representada nas análises realizadas.

Adicionalmente, uma análise mais refinada da filogenia de cada grupo de fungos foi realizada, onde sequências representativas de cada uma das UTOs foram comparadas com as presentes no banco dados. Dentre os grupos analisados, os três que apresentaram similaridade com gêneros de fungos, *Cladosporium* (13 UTOs), *Epicoccum* (24 UTOs) e *Nigrospora* (21 UTOs), mostraram-se bastante concisos filogeneticamente, agrupando quando presentes, sequências originárias dos distintos manguezais amostrados (Figura 6).

Figura 6 - Árvore filogenética das sequências afiliadas ao gênero *Cladosporium* (a), *Nigrospora* (b) e *Epicoccum* (c). Sequências representativas de diferentes UTOs, determinadas a 95% de similaridade. Em negrito, encontram-se as sequências retiradas do manguezal determinado como OilMgv

Já em relação aos outros dois grupos, classificados como 'uncultured fungi' (43 OTUs) e 'uncultured Basidiomycota' (24 OTUs), uma determinação mais detalhada da filogenia não foi possível. Entretanto, a comparação de tais sequências encontradas nos distintos manguezais, apenas com base na similaridade, mostrou a diferenciação de acordo com o manguezal amostrado, indicando que tais grupos são distintos em cada uma das áreas (Figura 7). Mais especificamente, foi possível observar a separação das sequências originadas da área de maior contaminação em relação às demais, novamente indicando a seleção deste contaminante sobre a comunidade de fungos. A maioria destas sequências com ocorrência diferencial mostrou-se afiliada a Basidiomycota, elegendo este grupo como candidato a ser

utilizado na biorremediação de manguezais contaminados. Um fato ainda não explorado em relação à microbiologia de manguezais é a ocorrência de leveduras neste ambiente, o que pode explicar em parte a grande abundância de fungos afiliados a Basidiomycota em tal ambiente.

Figura 7 - Filogenia das sequências afiliadas com fungos não cultiváveis e o grupo Basidiomycota não cultiváveis encontrados nos diferentes sedimentos de manguezais

2.3.4 Análise da comunidade fúngica de sedimentos de manguezais por meio de pirosequenciamento da região ITS

Na tentativa de expandir as análises realizadas, a metodologia de pirosequenciamento foi usada em dois aspectos, dando origem a um grupo de dados mais robusto para a melhor inferência sobre a comunidade fúngica presente nos sedimentos dos manguezais estudados. A primeira análise baseada em tal metodologia deu origem a um total de 20.719 sequências da região ITS, sendo este total distribuído em seis *datasets* (duas repetições de cada uma das áreas). Estas sequências foram afiliadas em sua grande maioria, por meio da afiliação taxonômica do banco de dados MG-RAST (média de 92,14%) a fungos, sendo os grupos dominantes os filos Ascomycota e Basidiomycota.

Figura 8 - Frequência relativa de sequências classificadas dentro dos filos Ascomycota e Basidiomycota em cada um dos grupos de sequências obtidos por meio de pirosequenciamento da região ITS

Observando a ocorrência de tais grupos dentre as áreas estudadas, fica clara a ocorrência diferencial de fungos de acordo com as características de cada manguezal. Em todas as áreas ocorre um domínio dos Ascomycota, mas é possível inferir, apenas comparando as frequências no manguezal contaminado, que a área com maior impacto da contaminação com óleo apresenta uma maior frequência de Basidiomycota (Figura 8), corroborando com os

dados anteriores. No entanto, a maior quantidade relativa deste grupo é observada na área do manguezal AntMgv (Figura 8). Arfi et al (2012) também encontraram este domínio de fungos pertencentes ao grupo Ascomycota estudando sedimentos de manguezais da nova Caledônia (Oceania). Vale ainda destacar, que esta observação é feita ao nível de filos, que podem conter organismos bastante distintos, o que pode mascarar tal inferência.

Dessa maneira, uma observação mais detalhada, por exemplo, ao nível de ordens é necessária para observarmos as diferenças que ocorrem entre as áreas estudadas. Temos assim que no total foram detectadas 26 ordens de fungos pertencentes a estes grupos (9 de Basidiomycota e 17 de Ascomycota). A ocorrência diferencial destas ordens foi avaliada por meio da análise de NMDS dos dados, que geraram os agrupamentos das amostras com base na ocorrência de sequências afiliadas a estas ordens (Figura 9). Pode-se concluir que tanto na análise conjunta dos filos (Figura 9), como nas análises separadas para cada filo, as amostras se separam de forma bastante clara, indicando a composição diferencial das comunidades fúngicas em cada uma das áreas estudadas. Os valores de estresse foram também bastante baixos; o que indica a robustez desta análise para inferirmos sobre esta estruturação das comunidades.

Figura 9 - Análises de NMDS dos conjuntos de sequências da região ITS fúngica obtidos por pirosequenciamento, tendo como base a ocorrência de grupos dentro de todas as sequências (a), e apenas considerando os grupos dentro dos filos Ascomycota (b) e Basidiomycota (c)

De forma geral, esta parte da análise nos indicou a separação de amostras oriundas de diferentes manguezais, e nos demonstrou a boa similaridade encontrada entre amostras obtidas das mesmas áreas (repetições). Isto deu base às análises independentes de taxonomia, onde os *datasets* de mesma área foram unidos, dando origem a uma única amostra de cada área de estudo.

Para este tipo de análise, foram obtidos inicialmente os índices de diversidade (1/Simpson) e de riqueza (ChaoI) de cada uma das amostras, bem como a cobertura ecológica (ICE) e o número de UTOs geradas a partir das sequências de cada uma das áreas (Tabela 3).

Tabela 3 - Número de sequências analisadas e índices ecológicos das comunidades de fungos de cada uma das áreas de manguezal estudadas

	Número de sequências	Número de OTUs	invsimpson	Chao	ICE
NOilMgv	17.432	236	7,63	4.583,33	0,99
OilMgv	354	45	17,82	563,70	0,96
AntMgv	2.196	121	6,77	1.935,45	0,97

Observando os valores obtidos, destacam-se inicialmente os altos valores de cobertura ecológica, que varia entre 0,96 e 0,99. Isto revela que a análise por meio deste tipo de sequenciamento gerou dados adicionais aos anteriormente obtidos por sequenciamento de Sanger, como descrito no item 2.2.3, onde os valores de cobertura atingiram aproximadamente 0,50. Adicionalmente, pode-se observar o número bastante de sequências obtidas para cada uma das áreas amostras, o que pode ter interferido de forma significativa nas demais estimativas. Sabe-se que as estimativas de riqueza pelo índice de Chao são sensíveis ao tamanho amostral (ROESCH et al., 2007). No presente estudo, devido a esta diferença nos números de sequências obtidas fica comprometida a comparação das áreas com base nestes índices ecológicos.

Com base nas limitações já descritas, uma boa alternativa para visualizar a ocorrência de grupos únicos ou comuns entre as áreas de estudo é por meio da geração de diagramas de Veen, que foram gerados considerando duas situações, levando em conta todas as UTOs obtidas, e apenas considerando aquelas contendo mais de 10 sequências (Figura 10). Na primeira situação, a maioria das UTOs foi alocada em áreas de exclusividade de cada uma das áreas estudadas; 179 para a área NOilMgv, 14 para OilMgv, e 76 UTOs exclusivas para a

área AntMgv, enquanto que apenas 11 grupos foram compostos de sequências oriundas das três áreas estudadas (Figura 10a). Porém, apesar de amplamente usada, esta análise não faz referência ao número de sequências componentes de cada uma das UTOs, o que pode levar a interpretações precipitadas em relação à abundância de organismos exclusivos ou compartilhadas entre as áreas estudadas. Desta forma, com o intuito de melhor inferir sobre tal característica nos manguezais alvos deste estudo, foi realizada a construção de um novo diagrama de Venn, apenas considerando as UTOs que apresentavam mais de 10 sequências em sua composição, totalizando 62 UTOs analisadas (Figura 10b). Esta análise demonstrou que quando tal restrição é imposta, diminui muito o número de UTOs exclusivas, enquanto se mantém mais constante os números de UTOs compartilhadas. Dessa forma, pode-se propor que os grupos exclusivos são comumente formados por UTOs representadas por poucas sequências (na maioria das vezes *singletons* ou *doubletons*), o que pode sugerir uma baixa significância ecológica de tais grupos no ambiente estudado. Este trabalho é inovador ao realizar tal análise, destacando a ocorrência deste grande número de grupos exclusivos representados por poucas sequências.

Figura 10 - Diagramas de Venn considerando todas as UTOs (a) e apenas aquelas compostas por mais de 10 sequências (b), evidenciando os grupos de fungos exclusivos e compartilhados dentre as áreas de manguezais estudadas

A filogenia dos organismos encontrados nas UTOs de maior abundância foi estudada por meio de comparação das sequências representativas de UTO com bancos de dados. Desta forma, foi possível observar de forma geral a distribuição das sequências das diferentes áreas dentro de cada um destes grupos abundantes (Figura 11). Destaca-se a formação de dois grupos dentro do filo Ascomycota, sendo um deles formado exclusivamente por sequências originadas de leveduras, identificadas via comparação por BlastN como

pertencentes ao grupo *Saccharomycetales*. Os demais grupos encontrados dentro de Ascomycota forma afiliados a *Xylariales*, *Hypocreales*, ascomicetos não cultivados. Destaca-se ainda a presença de grupos mais restritos encontrados anteriormente por meio de sequenciamento de Sanger, como os gêneros *Cladosporium* (UTO 109 - 21 sequências) e *Epicoccum* (UTO 2 - 1.328 sequências). Em relação ao grupo Basidiomycota, a sequências formaram um grupo conciso, onde os representantes encontrados foram também atribuídos a sequências de leveduras, com destaque para os gêneros *Rhodotorula* (UTOs 89, 91 e 93) e *Cryptococcus* (demais UTOs dentro de Basidiomycota) (Figura 11). A presença de leveduras, como descrito anteriormente, pode ser justificada pela condição ambiental, que favorece processos de fermentação, conhecidamente desempenhados por organismos deste grupo. Existem também indícios que tal grupo de microrganismos são assimiladores de hidrocarbonetos, sendo estes descritos como possíveis indicadores de contaminação de óleo em ambientes marinhos e estuarinos (Hagler, 2006).

Além destes grupos, um terceiro e diverso grupo foi composto apenas de sequências atribuídas a fungos não cultivados dentro do banco de dados, indicando que muito da diversidade fúngica em sedimentos de manguezais está para ser mais detalhadamente estudada, corroborando com dados da literatura (Arfi et al., 2012).

Numa observação mais detalhada da filogenia apresentada na figura 11, pode-se também observar a ocorrência diferencial de sequências alocadas dentro de cada UTO considerada. Para exemplificar tal observação, podemos tomar como exemplo as quatro UTOs de maior tamanho (que hospedam um maior número total de sequências), UTO7 (5.025 sequências), UTO14 (634 sequências), UTO39 (2.882 sequências) e UTO67 (883 sequências). Temos que dentre estas, duas hospedam preferencialmente sequências oriundas da área 1 do manguezal contaminado (NOilMgv) (UTOs 7 e 39), e outras duas são compostas preferencialmente de sequências oriundas do manguezal sem contaminação com óleo (AntMgv) (UTOs 14 e 67). Estas inferências reforçam a composição diferencial da comunidade fúngica nos manguezais estudados, e indica que tal alteração ocorre mesmo dentro de grupos de fungos ainda pouco conhecidos.

Figura 11 - Distribuição das 62 UTOs compostas de mais de 10 sequências originadas dos sedimentos de manguezais. As cores na árvore indicam os diferentes grupos taxonômicos encontrados, e as barras indicam a frequência das UTOs dentro de cada uma das áreas estudadas. Nos ramos, a presença de círculos indica o valor de *bootstrap* superior a 50

2.3.5 Descrição da comunidade eucariótica de sedimentos de manguezais por meio de metagenômica descritiva

Esta etapa do projeto foi desenvolvida tendo como base os metagenomas já previamente feitos das áreas de estudo. Estes metagenomas contam com uma grande quantidade de sequências, e foram gerados e inicialmente explorados por nosso grupo de pesquisa (ANDREOTE et al., 2012). Considerando as amostras contempladas no presente estudo, temos disponíveis um total de 249.993 sequências para a área NOilMgv, 231.233 para a área OilMgv, e 214.921 para a área AntMgv. Deste total, o número de sequências classificadas como pertencentes ao domínio Eukarya foram em média de 1,12% do total.

Em relação aos grupos de organismos descritos por meio desta análise, pode-se destacar a grande abundância de fungos, juntamente com a descrição de outros grupos, como Chordata, Arthropoda, Streptophyta, Chlorophyta e Bacillariophyta, entre outros (Figuras 12 a 14), dos quais se destaca um grupo de Eukarya não classificados. Dentre os grupos dominantes encontrados, o mais abundante foi o grupo Streptophyta (média de 24%), seguido de Ascomycota (aproximadamente 15%), Chordata (14%), Arthropoda (8%), e Basidiomycota (4%). Outros grupos estão representados nas figuras 12 a 14.

Figura 12 - Classificação taxonômica de sequências atribuídas ao domínio Eukarya em metagenomas de sedimentos de manguezais localizados na cidade de Bertioga. Essa figura representa a área NOiMgV

Figura 13 - Classificação taxonômica de sequências atribuídas ao domínio Eukarya em metagenomas de sedimentos de manguezais localizados na cidade de Bertioga. Essa figura representa a área OiMgV

Figura 14 - Classificação taxonômica de sequências atribuídas ao domínio Eukarya em metagenomas de sedimentos de manguezais localizados na cidade de Bertioga. Essa figura representa a área AntMgv

Destaca-se que por este tipo de análise não foram encontradas diferenças claras entre os grupos que ocorrem em cada uma das áreas, provavelmente por se tratar de uma análise com baixa cobertura, o que limita tais inferências. No entanto, tal análise indica a ocorrência de outros grupos de organismos eucarióticos neste ambiente, onde podem interagir com a diversidade microbiana, em especial, os fungos que habitam os sedimentos de manguezais. Estes dados corroboram com o estudo de Santos et al. (2010), que descreveram a diversidade de micro-organismos em manguezais com foco em microeucariotos. Estes autores indicam em seu trabalho uma predominância dos fungos (70%), seguida da abundância de *Stramenopiles* (25%) e *Alveolata* (9%). Outros estudos devem aprofundar o estudo sobre tais grupos, numa tentativa de melhor inferir nos fatores que controlam sua ocorrência, e em suas possíveis funcionalidades nos sedimentos de manguezais.

3 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho é inovador em acessar de forma robusta a comunidade de fungos presente em solos de um ambiente com características particulares, e ainda pouco explorado como os manguezais.

Os resultados mostram, com base em metodologias de grande resolução, a ocorrência diferencial, quantitativa e qualitativa, de fungos em áreas de manguezais submetidas a diferentes graus de contaminação. Dento deste aspecto, uma maior quantidade de fungos é sugerida nas áreas de maior contaminação com óleo, possivelmente indicando um papel deste grupo microbiano na degradação deste contaminante. Juntamente com esta maior abundância, a composição diferencial desta comunidade indica que grupos específicos possuem a capacidade de exercer tal papel na recuperação de áreas impactadas. Tais grupos são descritos, com os resultados aqui obtidos, como pertencentes ao grupo de Basidiomicetos ainda não conhecidos.

Adicionalmente a estas inferências, pode-se também indicar, que a utilização do pirosequenciamento adicionou conhecimento a comunidades fúngicas em manguezais, comprovando os resultados observados por outras metodologias, mas permitindo uma série de outras análises que deu suporte as observações anteriores. Destaca-se dentro destes resultados, a ampla ocorrência de grupos representados por poucas sequências de forma exclusiva nas áreas estudadas.

Desta forma, temos aqui apresentado o primeiro relato feito de forma extensiva e independente de cultivo, sobre as comunidades fúngicas que ocorrem em solos de manguezais. Outros estudos devem focar sobre a funcionalidade destes grupos, e a determinação de outros parâmetros ambientais cruciais ao funcionamento destes organismos.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-MARTINEZ, V.; DOWD, S.; SUN, Y.; ALLEN, V. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2762–2770, 2008.
- AHN, J.H.; KIM, M.S.; KIM, M.C.; LIM, J.S.; LEE, G.T.; YUN, J.K.; KIM, T.; KA, J.O. Analysis of bacterial diversity and community structure in forest soils contaminated with fuel hydrocarbon. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 16, p. 704-715, 2006.
- AITKEN, C.M.; JONES, D.M.; LARTER, S.R. Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. **Nature**, London, v. 431, p. 291-294, 2004.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. San Diego: Academic.Press, 1994. 453p.
- ALIAS, S.A. **Ecological and taxonomic studies of lignicolous marine fungi in Malaysian mangroves**. 1996. PhD (thesis) - Universidade de Portsmouth, U.K., 1996.
- ALLISON, S.D.; HANSON, C.A.; TRESEDER, K.K. Nitrogen fertilization reduces diversity and alters community structure of active fungi in boreal ecosystems. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1878–1887, 2007.
- ALMEIDA-FILHO, O.M.; BUENO, R.; BONONI, V.L. Algumas espécies de fungos Basidiomycetes de manguezais do Estado de São Paulo. **Hoehnea**, São Paulo, v. 20, p. 87 – 92, 1993.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143–169, 1995.
- AMARAL-ZETTLER, L.A.; ZETTLER, E.R.; THEROUX, S.M.; PALACIOS, C.; AGUILERA, A. Microbial community structure across the tree of life in the extreme Río Tinto. **ISME Journal**, New York, v. 5, p. 42–50, 2011.
- ANASTASI, A.; VARESE, G.C.; BOSCO, F.; CHIMIRRI, F.; MARCHISIO, V.F. Bioremediation potential of basidiomycetes isolated from compost. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 99, p. 6626-6630, 2008.
- ANDERSON, I.C.; CAMPBELL, C.D.; PROSSER, J.I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland – Scots pine (*Pinus Sylvestris* L.) gradient. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 5, p. 1121-1132, 2003a.
- ANDERSON, I.C.; CAMPBELL, C.D.; PROSSER, J.I. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 5, p. 36–47, 2003b.

ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 205p. Tese (Doutorado na área de Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ANDREOTE, F.D.; JIMÉNEZ, D.J.; CHAVEZ, D.; DIAS, A.C.F.; LUVIZOTTO, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C.C.; LOPEZ, M.V.; BAENA, S.; TAKETANI, R.G.; MELO, I.S. The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. **Plos One**, Oxford, v. 7, n. 6, e38600, 2012.

APINIS, A.E. Facts and problems. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 48, p. 93–109, 1972.

ARAUJO, F.V.; SOARES, C.A.G.; HAGLER, A.N.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. Ascomycetous yeasts communities of marine invertebrates in a Southeast Brazilian mangroves ecosystem. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 68, p. 91 – 99, 1995.

ARAÚJO, F.S.M.; LEMOS, J.L.S. Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2002. Local: Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT, 2002.

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

ARFI, Y.; MARCHAND, C.; WARTEL, M.; RECORD, E. Fungal diversity in anoxic-sulfidic sediments in a mangrove soil. **Fungal Ecology**, Oxford, v. 5, p. 282 – 285, 2012.

ATLAS, R.M.A. HOROWITZ, M. ;KRICHEVSKY, A.K. BEJ. Response of microbial populations to environmental disturbance. **Microbial Ecology**, New York, v. 22, p.249-256, 1991.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Hydrocarbon biodegradation and oil-spill remediation. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 12, p. 287-338, 1992.

ATLAS, R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 45, p. 180–209, 1981.

ATLAS, R.M. Microbial hydrocarbon degradation bioremediation of soil spills. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 52, p. 149–156, 1994.

AVANISS-AGHAJANI, E.; JONES, K.; CHAPMAN, D.; BRUNK, C. A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. **BioTechniques**, New York, v. 17, p. 144-149, 1994.

BALBA, M.T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 32, p. 155–164, 1998.

BARR, D.P.; AUST, S.D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 28, p. 78-87, 1994.

BASS, D.; HOWE, A.; BROWN, N.; BARTON, H.; DEMIDOVA, M.; MICHELLE, H.; LI, L.; SANDERS, H.; WATKINSON, S.C.; WILLCOCK, S.; RICHARDS, T.A. Yeast forms dominate fungal diversity in the deep oceans. **Proceedings Biological Sciences**, London, v. 274, p. 3069–3077, 2007.

BEGEROW, D.; NILSSON, H.; UNTERSEHER, M.; MAIER, W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, p. 99–108, 2010.

BENLLOCH, S.; MARTINEZ-MURCIA, A.J.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Sequencing of bacterial e archeal 16s rDNA genes directly amplified from a hypersaline environmental. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 18, p. 574-581, 1995.

BENTO, F.M. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 96, p. 1049-1055, 2005a.

BINLADEN, J.; GILBERT, M.T.P.; BOLLBACK, J.P.; PANITZ, F.; BENDIXEN, C. The Use of Coded PCR Primers Enables High-Throughput Sequencing of Multiple Homolog Amplification Products by 454 Parallel Sequencing. **Plos One**, Oxford, v. 2, p. 197, 2007.

BODAKER, I.; SHARON, I.; SUZUKI, M.T.; FEINGERSCH, R.; SHMOISH, M. Comparative community genomics in the Dead Sea: an increasingly extreme environment. **ISME Journal**, New York, v. 4, p. 399–407, 2010.

BONONI, V.L. Basidiomycetes do Parque Estadual da Ilha do Cardoso: IV. Adições às famílias Hymenochateacea, Stereacea e Thelephoraceae, **Rickia**, v. 11, p. 43 – 52, 1984.

BORNEMAN, J.; HARTIN, R.J. PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4356–4360, 2000.

BRITO, E.M.; DURAN, R.; GUYONEAUD, R.; GONI-URRIZA, M.; GARCIA DE OTEYZA, T.; CRAPEZ, M.A. A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v. 58, p. 418–423, 2009.

BRITO, E.M.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; VERBAERE, A.; CRAPEZ, M.A.C. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 157, p. 752–762, 2006.

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

BRUNS, T.D.; GARDES, M. Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi—taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 2, p. 233–242, 1993.

BUEÉ, M.; REICH, M.; MURAT, C.; MORIN, E.; NILSSON, R.H.; UROZ, S.; MARTIN, F. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. **New Phytologist**, Malden, v. 184, p. 449–456, 2009.

BUCHAN, A.; NEWELL, S.Y.; BUTLER, M.; BIER, E.J.; HOLLIBAUGH, J.T.; MORAN, M. A. Dynamics of bacterial and fungal communities on decaying salt marsh grass. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 6676–6687, 2003.

BUCHAN A.; NEWELL, S.Y.; MORETA, J.I.; MORAN, M.A. Analysis of internal transcribed spacer (ITS) regions of rRNA genes in fungal communities in a southeastern U.S. salt marsh. **Microbial Ecology**, New York, v. 43, p. 329–340, 2002.

BUMPUS, J.; TIEN, M.; WRIGHT, D.; AUST, S. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. **Science**, Washington, v. 228, p. 1434–1436, 1985.

BURNS, K.A.; CODI, S.; PRATT, C.; DUKE, N.C. Weathering of hydrocarbons in mangrove sediments: Testing the effects of using dispersant to treat oil spills. **Organic Geochemistry**, Washington, v. 30, p. 1273–1286, 1999.

BURNS, K.A.; CODI, S.; DUKE, N.C. Gladstone, Australia Field Studies: Weathering and Degradation of Hydrocarbons in Oiled Mangrove and Salt Marsh Sediments With and Without the Application of an Experimental Bioremediation Protocol. **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v. 41, p. 392–402, 2000.

BRIDGE, P.; SPOONER, B. Soil fungi: diversity and detection. **Plant and Soil**, London, v. 232, p. 147–154, 2001.

CABANA, H.; JONES, J.P.; AGATHOS, S.N. Preparation and characterization of cross-linked lacase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 132, p. 23–31, 2007.

CAMPOS, E.L.; CAVALCANTI, M.A.Q. Primeira ocorrência de *Phellinus mangrovicus* (Imaz.) Imaz. para o Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 14, p. 263 – 265, 2000.

CAMPOS, E.L.; SOTÃO, H.M.P.; CAVALCANTI, M.A.Q.; LUZ, A.B. Basidiomycetes de Manguezais da APA de Algodual – Maiandeuá, Pará, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi** 1, Belém, v. 1, p. 141 – 146, 2005.

CARROLL, G.C.; WICKLOW, D.T. The fungal community: its organization and role in the ecosystem. 2nd ed. New York: M. Dekker, 1992.

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

CERNIGLIA, C.E.; GIBSON, D.T. Oxidation of Benzo[a]pyrene by the Filamentous Fungus *Cunninghamella elegans*. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 254, p. 12174-12180, 1979.

CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, London, v. 3, p. 351-368, 1992.

CERNIGLIA, C.E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Seoul, v. 19, p. 324- 333, 1997.

CERNIGLIA, C.E.; SUTHERLAND, J.B. In: TIMMIS, K.N.; MCGENITY, T.; VAN DER MEER, J.R.; DE LORENZO, V.(Ed.). **Handbook of Hydrocarbon and Lipid**. Springer, 2010. p. 2079–2110.

CHANG, B.V.; CHANG, I.T.; YUAN, S.Y. Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 80, p. 145–149, 2008.

COSTA, I.P.M.W. **Fungos endofíticos isolados de vegetais do manguezal do Rio Paripe, Ilha de Itamaracá, Pernambuco, Brasil**. 2003. 72p. Dissertação (Mestrado em Micologia Básica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J.C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 121-128, 2000.

CITRÓN, G.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Introducción a la ecología del manglar**. Montevideo:UNESCO/RESTLOC., 1983. 109p.

CÔRREA, O.L.S. **Petróleo: noções sobre exploração, perfuração, produção e microbiologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 90p.

COSTA, R.; SALLES, J.F.; BERG, G.; SMALLA, K. Cultivation-independent analysis of *Pseudomonas* species in soil and in the rhizosphere of field-grown *Verticillium dahliae* host plants. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 2136-2149, 2006.

COURTOIS, S.; CAPPELLANO, C.M.; BALL, M.; FRANCOU, F.X.; NORMAND, P.; HELYNCK, G.; MARTINEZ, A.; KOLVEK, S.J.; HOPKE, J.; OSBURNE, M.S.; AUGUST, P.R.; GUERINEAU, M.; JEANNIN, P.; SIMONET, P.; PERNODET, J.L. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 49-55, 2003.

CRÁPEZ, M.A.C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.S.; PREREIRA, D.C. Tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 30, p. 32–37, 2002.

CUNHA, C.D.; LEITE, S.G.F. Gasoline Biodegradation in different soil microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 45–49, 2000.

CURY, J.C. **Atividade microbiana e diversidade 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.

CUYPERS, C. **Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and sediments: Prediction of bioavailability and characterization of organic matter domains**. 2001. 161p. Ph.D. (thesis) - Wageningen University, Wageningen, Netherlands, 2001.

CLEMENTE A.R. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 255-261, 2001.

DANIEL, R. The soil metagenome - a rich resource for the discovery of novel natural products. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.15, p. 199–204, 2004.

DANIEL, R. The Metagenomics of soil. **Nature**, London, v. 3, p. 471-478, 2005.

DE ANGELI, S.K.M.; GLADDEN, J.M.; ALLGAIER, M.; D’HAESELEER, P.; FORTNEY, J.L. Strategies for enhancing the effectiveness of metagenomic based enzyme discovery in lignocellulolytic microbial communities. **Bioenergy Research**, Oxford, v. 3, p. 146–158, 2010.

DELONG, E.F.; PRESTON, C.M.; MINCER, T.; RICH, V.; HALLAM, S.J. Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean’s interior. **Science**, Washington, v. 311, p. 496–503, 2006.

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

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

DORAN, J.W.; ZEISS, M.R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 1, p. 3–11, 2000.

DUKE, N.C.; BURNS, K. A.; SWANNELL, R.P.J.; DALHAUS, O.; RUPP, R.J. Dispersant use and a bioremediation strategy as alternate means of reducing impacts of large oil spills on mangroves: the Gladstone Field Trials. **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v. 41, p. 403–412, 2000.

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

EMBLEY, T.M. Multiple secondary origins of the anaerobic lifestyle in eukaryotes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 361, p. 1055–1067, 2006.

ERIKSSON, M.; DALHAMMAR, G.; BORG-KARLSON, A.K. Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 53, p. 619–626, 2000.

ERWIN, D.P.; ERICKSON, I.K.; DELWICHE, M.E.; COLWELL, F.S.; STRAP, J.L.; CRAWFORD, R.L. Diversity of Oxygenase Genes from Methane- and Ammonia-Oxidizing Bacteria in the Eastern Snake River Plain Aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, Heidelberg, v. 71, p. 2016–2025, 2005.

ESTEVE-NUNEZ, A.; CABALLERO, A.; RAMOS, J.L.; Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 65, p. 335–352, 2001.

FERREIRA, T.O. **Solos de Mangue do Rio Crumanhú (Guarujá-SP):** pedologia e contaminação por esgoto doméstico. 2002. 113p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

FERRER, M.; GOLYSHINA, O.V.; CHERNIKOVA, T.N.; KHACHANE, A.N.; REYES-DUARTE, D.; SANTOS, V.A.; STROMPL, C.; ELBOROUGH, K.; JARVIS, G.; NEEF, A.; YAKIMOV, M.M.; TIMMIS, K.N.; GOLYSHIN, P.N. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, p. 1996-2010, 2005b.

FIERER, N.; JACKSON, J.A.; VILGALYS, R.; JACKSON, R.B. Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. **Applied and Environmental Microbiology**, Heidelberg, p. 4117–4120, 2005.

FIELD, J.A.; DEJONG, E.; COSTA, G.F.; DEBONT, J.A.M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Heidelberg, v. 58, p. 2219- 2226, 1992.

FRANKLIN, R.B.; BLUM, L.K.; MCCOMB, A.C. A geostatistical analysis of small-scale spatial variability in bacterial abundance and community structure in salt marsh creek bank sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v.42, p.71-80, 2002.

FREEMAN, W.M.; WALKER, S.J.; VRANA, K.E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **Biotechniques**, Natick, v. 26, p. 112-125, 1999.

FISHER, A.G. Latitudinal variations in organic diversity. **Evolution**, New York, v. 14, p. 64–81, 1961.

GAMERO, R.M.P. **Mineralogia, físico-química e classificação dos solos de mangue do Rio Iriri no Canal de Bertioga (Santos, SP).** 2001. 76p. Dissertação (Mestrado na área de Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 2, p. 113–118, 1993.

GINOLHAC, A.; JARRIN, C.; GILLET, B.; ROBE, P.; PUJIC, P.; TUPHILE, K.; BERTRAND, H.; VOGEL, T.M.; PERRIÈRE, G.; SIMONET, P.; NALIN, R. Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. **Applied and Environmental Microbiology**, Heidelberg, v. 70, p. 5522–5527, 2004.

GIOVANNONI, S.J.; BRITSCHGI, T.B.; MOYER, C.L.; FIELD, K.G. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. **Nature**, London, v. 345, p. 60–63, 1990.

GIRVAN, M.S.; BULLIMORE, J.; BALL, A.S.; PRETTY, J.N.; OSBORN, A.M. Responses of active bacterial and fungal communities in soil under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. **Applied and Environmental Microbiology**, Heidelberg, v. 70, p. 2692–2701, 2004.

GOJKOVIC, Z.; KNECHT, W.; ZAMEITAT, E.; WARNEBOLDT, J.; COUTELIS, J.B.; PYNIAHA, Y.; NEUVEGLISE, C.; MØLLER, K.; LÖFFLER, M.; PISKUR, J. Horizontal gene transfer promoted evolution of the ability to propagate under anaerobic conditions in yeasts. **Molecular Genetics Genomics**, Berlin, v. 271, p. 387–93, 2004.

GOMES, N.M.; BORGES, L.R.; PARANHOS, R.; PINTO, F.N.; MENSONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 66, p. 96–109, 2008.

GOMES, N.C.M.; FAGBOLA, O.; COSTA, R.; RUMJANEK, N.G.; BUCHNER, A.; MENDONA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. **Applied and Environmental Microbiology**, Heidelberg, v. 69, p. 3758–3766, 2003.

GUGLIOTTA, A.M.; CHAPELARI, M. Polyporacea from Ilha do Cardoso, São Paulo, Brasil. **Mycotaxon**, Mainz, v. 56, p. 107 – 113, 1995.

GUGLIOTTA, A.M.; BONONI, V.L.R. Polyporacea do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Botânica**, São Paulo, v.12, p. 1- 112, 1999.

GUO, C.L.; ZHOU, H.W.; WONG, Y.S.; TAM, N.F.Y. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam v. 51, p. 1054–1061, 2005.

HALL, C.; BRACHAT, S.; DIETRICH, F.S. Contribution of horizontal gene transfer to the evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 4, p. 1102–1115, 2005.

HATA, T.; KAWAI, S.; OKAMURA, H.; NISHIDA, T. Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation. **Biodegradation**, London, v. 21, p. 681–689, 2010.

HAGLER, A.N.; ROSA, C.A.; MORAES, P.B.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; FRANCO, G.M.O.; ARAUJO, F.V.; SOARES, C.A.G. Yeasts and coprophyllic bacteria of water accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of Southeast Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, p. 973 – 977, 1993.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington v. 68, p. 669-685, 2004.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemical Biology**, Sharjah, v. 5, p. 245-249, 1998.

HANSON, R.S.; HANSON, T.E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, p. 439, 1996.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L.Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature Reviews Microbiology**, London, v 9, p. 177–192, 2011.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycology Research**, Cambridge, v. 105, p. 422–1432, 2001.

HAWARI, J.; BEAUDET, S.; HALASZ, A.; THIBOUTOT, S.; AMPLEMAN, G. Microbial degradation of explosives: biotransformation versus mineralization. **Applied and Environmental Microbiology**, Heidelberg, v. 54, p. 605–618, 2000.

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, New York, v.35, p.1-21, 1998.

HERZ, R. **Manguezais do Brasil**. São Paulo: USP; IO, 1991. 227p.

HILL, G.T.; MITKOWSKI, N.A.; ALDRICH-WOLFE, L.; EMELE, L.R.; JURKONIE, D.D.; FICKE, A.; MALDONADO-RAMIREZ, S.; LYNCH, S.T.; NELSON, E.B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 25–36, 2000.

HIRSCH, P.R.; MAUCLINE, T.H.; CLARK, I.M. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 878-887, 2010.

HOFF, K.J. The effect of sequencing errors on metagenomic gene prediction. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 520, 2009.

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

HORTON, T.R.; BRUNS, T.D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the blackbox. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 1855–71, 2001.

HOSHINO, Y.T.; MATSUMOTO, N. Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. **Soil Science & Plant Nutrition**, Nishigara, v. 53, p. 40–55, 2007.

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

HUGHES, J.B.; BECKLES, D.M.; CHANDRA, S.D.; WARD, C.H. Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH-contaminated sediments. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 18, p. 152–160, 1997.

HUGHES, K.A.; BRIDGE, P.; CLARK, M.S. Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. **Science of Total Environment**, Amsterdam, v. 372, p.539–548, 2007.

HUSE, S.M.; DETHLEFSEN, L.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; RELMAN, D.A.; SOGIN, M.L. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 4, 2008.

HUSSAIN, Q.; LIU, Y.; ZHANG, A.; PAN, G.; LI, L.; ZHANG, X.; SONG, X.; CUI, L.; JIN, Z. Variation of bacterial and fungal community structures in the rhizosphere of hybrid and standard rice cultivars and linkage to CO₂ flux. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 78, p. 116–128, 2011.

INSKEEP, W.P.; RUSCH, D.B.; JAY, Z.J.; HERRGARD, M.J.; KOZUBAL, M.A. Metagenomes from high-temperature chemotrophic systems reveal geochemical controls on microbial community structure and function. **Plos One**, San Francisco, v. 5, 2010.

IPIECA-International Petroleum Industry Environmental Conservation Association.
Biological impacts of oil pollution: Mangroves, v. 4, p. 20, 1993.

JAITLEY, A.K. Ph optima of the fungi isolated from mangroves soils in India. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, Tokyo, v. 28, p. 137 – 143, 1987.

JAITLEY, A.K.; RAI, J.N. Termophilic and thermotolerant fungi isolated from mangroves swamps. **Mycologia**, Lancaster, v. 6, n.74, p. 1021 – 1022, 1982.

JAMES, T.Y.; LETCHER, P.M.; LONGCORE, J.E.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.E.; PORTER, D. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). **Mycologia**, Lancaster, v. 98, p. 860–871, 2006b.

JEBARAJ, C.S.; RAGHUKUMAR, C. Anaerobic denitrification in fungi from the coastal marine sediments off Goa, India. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, p. 100–109, 2009.

JEBARAJ, C.S.; RAGHUKUMAR, C.; BEHNKE, A.; STOECK, T. Fungal diversity in oxygen-depleted regions of the Arabian Sea revealed by targeted environmental sequencing

combined with cultivation. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 71, p. 399–412, 2009.

JESUS, E.C. **Bacterial diversity in soils from different land use systems of the western Brazilian Amazon**. 2008. 155p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

JOHNSEN, A.R.; WICKB, L.Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, Barking, v. 133, p. 71-84, 2005.

JONES, E.B.G.; ALIAS, S.A. Biodiversity of Mangrove Fungi. **Biodiversity of Tropical Microfungi**, Boca Raton, v. 6, p. 71 – 92, 1997.

JUHASZ, A.L.; NAIDU, R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 45, p. 57-88, 2000.

JUNGHANNS, C.; MOEDER, M.; KRAUSS, G.; MARTIN, C.; SCHLOSSER, D. Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. **Microbiology**, Reading v. 151, p. 45–57, 2005.

KABIR, S.N. RAJENDRAN, N.; AMEMIYA, T.; ITOH, K. Quantitative measurement of fungal DNA extracted by three different methods using realtime polymerase chain reaction. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 96, p. 337–343, 2003.

KE, L.; WANG, W.Q.; WONG, T.W.Y.; WONG, Y.S.; TAM, N.F.Y. Removal of pyrene from contaminated sediments by mangrove microcosms. **Chemosphere**, Oxford, v. 51, p. 25–34, 2003.

KIM, U.J.; BIRREN, B.W.; SLEPAK, T.; MANCINO, V.; BOYSEN, C.; KANG, H.L.; SIMON, M.I.; SHIZUYA, H. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. **Genomics**, San Diego, v. 34, p. 213-218, 1996.

KLAMER, M.; ROBERTS, M.S.; LEVINE, L.H.; DRAKE, B.G.; GARLAND, J.L. Influence of elevated CO₂ on the fungal community in a coastal scrub oak forest soil investigated with terminal-restriction fragment length polymorphism analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4370–4376, 2002.

KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E. **Marine mycology: The higher fungi**. New York :Academic Press, 1979. 690p.

KOLB, S.; KNIEF, C.; STUBNER, S.; CONRAD, R. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel pmoA-targeted real-time PCR assays. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 2423-2429, 2003.

KONSTANTINIDIS, K.T.; BRAFF, J.; KARL, D.M.; DELONG, E.F. Comparative metagenomic analysis of a microbial community residing at a depth of 4000 meters at station ALOHA in the North Pacific subtropical gyre. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 5345–5355, 2009.

- KORDA, A.; SANTAS, P.; TENENTE, A.; SANTAS, R. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 48, p. 677–686, 1997.
- KOWALCHUK, G.A.; VAN OS, G.J.; VAN AARTRIJK, J.; VAN VEEN, J.A. Microbial community responses to disease management soil treatments used in flower bulb cultivation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 37, p. 55–63, 2003.
- KUBOTA, K.; KOMA, D.; MATSUMIYA, Y.; CHUNG, S.Y.; KUBO, M. Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. **Biodegradation**, London, v. 19, p. 749–757, 2008.
- 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, v. 4, p.43-84, 2005.
- LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science**, Washington, v. 312, p. 1917–1917, 2006.
- LANE, D.J.; STAHL, D.A.; OLSEN, G.J.; HELLER, D.J.; PACE, N.R. Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 163, p. 75–81, 1985.
- LANOIL, B.D.; LA DUC, M.T.; WRIGHT, M.; KASTNER, M.; NEALSON, K.H.; BARTLETT, D. Archeal diversity in ODP legacy borehole 892b and associated seawater and sediments of the Cascadia Margin, **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 54, p. 167–177, 2005.
- LE BORGNE, S.; PANIAGUA, D.; VAZQUES-DUHALT, R. Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archaea. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Seoul, V. 15, p 74–92, 2008.
- LEE, K.; TREMBLAY, G.H.; LEVY, E.M. Bioremediation: application of slow-release fertilizers on low-energy shorelines. In: 1993 OIL SPILL CONFERENCE. 1993. Washington.:American Petroleum Institute, 1993. p 449–454.
- LIANG, J.B.; CHEN, Y.Q.; LAN, C.Y.; TAM, N.F.Y.; ZAN, Q.J.; HUANG, L.N. Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. **Marine Biology**, Berlin, v. 150, p. 739–747, 2007.
- LI, H.; ZHAO, Q.; BOUDFADEL, M.C.; VENOSA, A. A universal nutrient application strategy for bioremediation of oil-polluted beaches. **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v. 54, p. 1146–1161, 2007.
- LI, X.R.; MA, E.B.; YAN, L.Z.; MENG, H.; DU, X.W.; ZHANG, S.W.; QUAN, Z.X. Bacterial and fungal diversity in the traditional Chinese liquor fermentation process. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 146, p. 31–37, 2011.

LILES, M.R.; MANSKE, B.F.; BINTRIM, S.B.; HANDELSMAN, J.E.; GOODMAN, R. M. A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 2684–2691, 2003.

LIM, Y.W.; KIM, B.K.; KIM, C.; JUM, H.S.; KIM, B-S.; LEE, J-H.; CHUN, J. Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 48, n. 3, p. 284-289, 2010.

LIU, Z.; LOZUPONE, C.; HAMADY, M.; BUSHMAN, F.D.; KNIGHT, R. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35: e120, 2007.

LLOYD, H.L.; Pathogenic stability of *Alternaria longipes* (Ell. & Ev.) Mason subjected to different methods of isolation, storage and inoculum production. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 38, p. 33-39, 1969.

LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 510-516, 2005.

LORENZ, P.; LIEBETON, K.; NIEHAUS, F.; ECK, J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, p. 572-657, 2002.

LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

LUAN, T.G.; YU, K.S.H.; ZHONG, Y.; ZHOU, H.W.; LAN, C.Y.; TAM, N.F.Y. Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 2289–2296, 2006.

LYNCH, J.M; BRAGG, E. Microorganism and soil aggregate stability. **Advances in Soil Science**, New York, v.2, p.133-171, 1985.

MANCERA-LÓPEZ, M.E.; ESPARZA-GARCÍA, F.; CHÁVEZ-GÓMEZ, B.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; BARRERA-CORTÉS, J. Bioremediation of an aged hydrocarbon contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 61, p. 151–160, 2008.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, p. 650-663, 2001.

MARGESIN, R.; LABBE, D.; SCHINNER, F.; GREER, C.W.; WHYTE, L.G. Characterization of hydrocarbon degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 3085–3092, 2003.

MARGULIES, M. Genome sequencing in open micro fabricated high density picoliter reactors. **Nature**, London, v. 437, p. 376-380, 2005.

MARZORATI, M.; DE FERRA, F.; VAN RAEMDONCK, H.; BORIN, S.; ALLIFRANCHINI, E.; CARPANI, G.; SERBOLISCA, L.; VERSTRAETE, W.; BOON, N.; DAFFONCHIO, D. A novel reductive dehalogenase, identified in a contaminated groundwater enrichment culture and in *Desulfitobacterium dichloroeliminans* strain DCA1, is linked to dehalogenation of 1,2-dichloroethane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 2990-2999, 2007.

MESTER, T.; TIEN, M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 46, p. 51-59, 2000.

MCGRANTH, K.C.; THOMAS-HALL, S.R.; CHENG, C.T.; LEO, L.; ALEXA, A.; SCHMIDT, S.; SCHENK, P.M. Isolation and analysis of mRNA from environmental microbial communities. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, p. 172-176, 2008.

MONCHY, S.; SANCIU, G.; JOBARD, M.; RASCONI, S.; GERPHAGNON, M.; CHABÉ, M.; CIAN, A.; MELONI, D.; NIQUIL, N.; CHRISTAKI, U.; VISCOGLIOSI, E.; SIME-NGANDO, T. Exploring and quantifying fungal diversity in freshwater lake ecosystems using Rdna cloning/sequencing and SSU tag pyrosequencing. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 13, p. 1433-1453, 2011.

MORIMOTO S.; FUJII, T. A new approach to retrieve full lengths of functional genes from soil by PCR-DGGE and metagenome walking. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 83, p. 389-396, 2009.

MUYZER, G.; DEWAAL, E.C. Uitterlinden. Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S Ribosomal RNA. **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 Leeuwenhoekv**, Wageningen, v. 73, p. 127-141, 1998.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853-858, 2000.

NOAA (2002). Oil Spills in Mangroves: Planning and response considerations. Washington, D.C.

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.

O'BRIEN, H.E.; PARRENT, J.L.; JACKSON, J.A.; MONCALVO, J.M.; VILGALYS, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 5544-5550, 2005.

ODOKUMA, L.O.; Dickson, A.A. Bioremediation of a crude oil polluted tropical mangrove environment. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, Port Harcourt, v. 7, p. 23-29, 2003.

OKANO, Y.; HRISTOVA, K.R.; LEUTENEGGER, C.M.; JACKSON, L. E.; DENISON, R. F.; GEBREYESUS, B.; LEBAUER, D.; SCOW, K.M. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 1008-1016, 2004.

OLIVEIRA, S.D. Emprego de fungos filamentosos na biorremediação de solos contaminados por petróleo: Estado da arte. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 67p.

PEIXOTO, R.S.; SILVA, R.F.; ROSADO, A.S. Biorremediação de ambientes contaminados com petróleo e seus derivados. **Microbiologia in foco**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 17-30, 2009.

PENNANEN, T.; CAUL, S.; DANIELL, T.J.; GRIFFITHS, B.S.; RITZ, K.; WHEATLEY, R. E. Community-level responses of metabolically-active soil microorganisms to the quantity and quality of substrate inputs. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 841-848, 2004.

PEREZ-NOVO, C.A.; CLAEYS, C.; SPELEMAN, F.; CAUWENBERGE, P. V.; BACHERT, C., VANDESOMPELE, J. Impact of RNA quality on reference gene expression stability. **BioTechniques**, London, v. 39, p. 52-56, 2005.

PIEL, J.; HUI D.; FUSETANI, N.; MATSUNAGA, S. Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 6, p. 921-927, 2004.

PINEDO-RILLA, C.; ALEU, J.; COLLADO, I. G. Pollutants biodegradation by fungi. **Current organic chemistry**, Hilversum, v. 13, p. 1194-1214, 2009.

PRINCE, R.C.; VARADARAJ, R.; FIOCCO, R.J.; LESSARD R.R. Bioremediation as an oil spill response tool. **Environmental Technology**, London, v. 20, p. 891-896, 1999.

PRINCE, R.C. TIMMIS, K.N.; MCGENITY, T.; VAN DER MEER, J.R.; DE LORENZO, V.(Ed.). **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, Springer, 2010. p. 2065-2078.

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P.; ELLIS, R.J.; FIRESTONE, M.K.; FRECKLETON, R.P.; GREEN, J.L.; GREEN, L.E.; KILLHAM, K.; LENNON, J.J.; OSBORN, A.M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C.J.; YOUNG, J.P.W. Essay - The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 384-392, 2007.

POINTING, S.B. Feasibility of bioremediation by white rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 57, p. 20-33, 2001.

PORTER, T.M.; GOLDING, G.B. Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons? **New Phytologist**, Oxford, v. 192, p. 1-8, 2011.

PURDY, K.J.; MUNOSON, M.A.; NEDWELL, D.B.; EMBLEY, T.M. Comparison of molecular diversity of the methanogenic community at the brackish and marine ends of a UK estuary. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v.39, p.17-21, 2002.

QUAISER, A.; ZIVANOVIC, Y.; MOREIRA, D.; LOPEZ-GARCIA, P. Comparative metagenomics of bathypelagic plankton and bottom sediment from the Sea of Marmara. **ISME Journal**, New York, v. 5, p. 285–304, 2011.

QUAISER, A.; OCHSENREITER, T.; LANZ, C.; SCHUSTER, S. C.; TREUSCH, A. H.; ECK, J.; SCHLEPER, C. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 50, p. 563–575, 2003.

RAGHUKUMAR, S. The role of fungi in marine detrital processes. In: RAMAIAH, N.(Ed.) **Marine Microbiology: Facets and Opportunities**. Goa, India: Natl. Inst. Oceanogr., 2004. p. 91–101.

RAEYMAEKERS, L. Basic principles of quantitative PCR. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 15, p. 115–122, 2000.

RAMSAY, M.A.; SWANNELL, R.P.J.; SHIPTON, W.A.; DUKE, N.C.; HILL, R.T. Effect of bioremediation community in oiled mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v. 41, p. 413–419, 2000.

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

RAPPÉ, M.S.; GIOVANNONI, S.J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 369–394, 2003.

REICHE, A.P.; LEMOS, J.L.S. Estudo do Potencial de Degradação de Petróleo de Linhagens de Fungos Isoladas de solo Nordeste. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2006. Rio de Janeiro, 2006

RICHARDS, T.A.; BASS, D. Molecular screening of free-living microbial eukaryotes: diversity and distribution using a meta-analysis. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 8, p. 240–252, 2005.

PENG, R.H.; XIONG, A.S; XUE, Y.; FU, X.Y.; GAO, F.; ZHAO, W.; TIAN, Y. S.; YAO, Q. H. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 32, p. 927–955, 2008.

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.M.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H.; CAMARGO, F.A.O.; FARMERIE, W.G.; TRIPLETT, E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **ISME Journal**, New York, p. 283–290, 2007.

RÖLING, W.F.M.; HEAD, I.M.; LARTER, S.R. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: Perspectives and prospects. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 154, p. 321–328, 2003.

RONAGHI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 11, p. 3–11, 2001.

RONAGHI, M.; UHLÉN, M.; NYRÉN, P. A sequencing method based on real-time PYROPHOSPHATE. **Science**, Washington, v. 281, p. 363–365, 1998.

RONDON, M.R.; AUGUST, P.R.; BETTERMANN, A.D.; BRADY, S.F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M.R.; LOIACONO, K.A.; LYNCH, B.A.; MACNEIL, I.A.; MINOR, C.; TIONG, C.L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M.S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 2541–2547, 2000.

RONDON, M.R.; GOODMAN, R.M.; HANDELSMAN, J. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 17, p. 403–409, 1999a.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. In: MELLO, I.S. (Ed). **Genética e melhoramento de microrganismos**. São Paulo: EdUSP, 2002. p. 97–129.

ROUSK, J.; BAATH, E.; BROOKES, P.C.; LAUBER, C.L.; LOZUPONE, C.; CAPORASO J.G.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **ISME Journal**, New York, v. 4, p. 1340–1351, 2010.

ROSENZWEIG, M. **Species diversity in space and time**. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1995.

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

SALANITRO, J.P. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil. **Advances in Agronomy**, New York, v. 72, p. 53–105, 2001.

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

SANDERS, H.L.; GRASSLE, J.F.; HAMPSON, G.R.; MORSE, L.S.; GARNER-PRICE, S.; JONES, C.C. Anatomy of an oil spill: Long-term effects from the grounding of the barge Florida off West Falmouth, Massachusetts. **Journal of Marine Research**, New Haven, v. 38, p. 265-380, 1980.

SANTOS, A.L.; PEIXOTO, R.; ROSADO, A. New approaches to understanding microbial diversity in wastewater, landfills and leachate treatment. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 13, p. 631– 648, 2009.

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

SANTOS, H.F.; CURY, J.C.; DO CARMO, F.L.; SANTOS, A.L.; TIEDJE, J.; VAN ELSAS, J.D.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R.S. Mangrove Bacterial Diversity and the Impact of Oil Contamination Revealed by Pyrosequencing: Bacterial Proxies for Oil Pollution. **Plos One**, Oxford, v. 6, n. 3, 2011.

SARASWATHY, A.; HALLBERG, R. Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gaswork site. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 210, p. 227-232, 2002.

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

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M.L.G.; DE-ROSA, T. Brazilian mangroves . **Aquatic Ecosystem Health and Management**, Ontario, v.3, p. 561-570, 2000.

SCHLOSS, P.D; WESTCOTT S.L; RYABIN, T; HALL, J.R; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B; LESNIEWSKI, R.A; OAKLEY, B.B; PARKS, D.H; ROBINSON C.J.; SAHL, J.W; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; VAN HORN, D.J.; WEBER, C.F. Introducing mothur: open- source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

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

SCHMIT, J.; MUELLER, G. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 16, p. 99–111, 2007.

SCHOCKEN, M. J.; GIBSON, D.T. Bacterial oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, p. 10-16, 1984.

SEKIGUCHI, H.; HASEGAWA, H.; OKADA, H.; KUSHIDA, A.; TAKENAKA, S. Comparative analysis of environmental variability and fungal community structure in soils between organic and conventional commercial farms of cherry tomato in Japan. **Microbes and Environments / JSME**, Tagajo, v. 23, p. 57–65, 2008.

SETTE, L.D.; SIMIONI, K.C.M.; VASCONCELLOS, S. P.; DUSSAN, L. J.; NETO, E. V.; OLIVEIRA, V. M. Analysis of composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 91, p. 253–266, 2007.

SHI, Y.; TYSON, G.W.; EPPLEY, J.M.; DELONG, E.F. Integrated metatranscriptomic and metagenomic analyses of stratified microbial assemblages in the open ocean. **ISME Journal**, New York, v. 5, p. 999-1013, 2010.

SHIZUYA, H.; BIRREN, B.; KIM, U, J.; MANCINO, V.; SLEPAK, T.; TACHIRI, Y.; SIMON, M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America/PNAS**, Washington, v. 89, p. 8794-8797, 1992.

SIMON, C.; WIEZER, A.; STRITTMATTER, A.W.; DANIEL, R. Phylogenetic diversity and metabolic potential revealed in a glacier ice metagenome. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 7519-7526, 2009.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; VAN ELSAS, J.D.; WERNARS, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2614–2621, 1999.

SMITHS, T.H.M.; BALADA, S.B.; WITHOLT, B.; VAN BEILEN, J. B. 2002. Functional analysis of alkane hydroxylases from Gram-negative and Grampositive bacteria. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 184, p. 1733-1742, 2002.

SMITH, A.C; KOSTKA, J.E.; DEVEREUX, R.; YATES, D.F. Seasonal composition and activity of sulfate-reducing prokaryotic communities in sea grass bed sediments. **Aquatic Microbial Ecology**, New York, v. 37, p. 183-184, 2004.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal Symbiosis**, London: Academic Press, 1997. 605p.

SETALA, H.; MCLEAN, M.A. Decomposition rate of organic substrates in relation to the species diversity of soil saprophytic fungi. **Oecologia**, Berlin, v. 139, p. 98–107, 2004.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P. R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 12115-12120, 2006.

SONG J.S.; JEON, J.H.; LEE, J.H.; JEONG, S.H.; JEONG, B.C, KIM, S.J.; LEE, J.H.; LEE, S.H. Molecular Characterization of TEM-type β -Lactamases Identified in Cold-Seep Sediments of Edison Seamount (South of Lihir Island, Papua New Guinea). **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 43, p. 172-178, 2005.

- SONG, Z.; VAIL, A.; SADOWSKY, M.J.; SCHILLING, J.S. Competition between two wood-degrading fungi with distinct influences on residues. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 79, p. 109-117, 2012.
- SOUSA, O.V.; MACRAE, A.; MENEZES, F.G.R.; GOMES, N.C.M.; VIEIRA, R.H.S.F.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.S. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v. 52, p. 1725–1734, 2006.
- STAJICH, J. The fungi. **Current Biology**, London, v. 19, p. 840–845, 2009.
- STEENWERTH, K.L.; JACKSON, L.E.; CALDERON, F.J.; STROMBERG, M. R.; SCOW, K. M. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 1599-1611, 2002.
- STEFFEN, K.T. Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.60, p.212-217, 2002.
- STOECK, T.; BASS, D.; NEBEL, M.; CHRISTEN, R. JONES, M.D. BREINER, H.W.; RICHARDS, T.A. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, p. 21–31, 2010.
- STRAATSMA, G.; AYER, F.; EGLI, S. Species richness, abundance, and phenology of fungal fruit bodies over 21 years in a Swiss forest plot. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 515–523, 2001.
- STRALHER, A.N.; STRALHER, A.H. **Geografía física**. 3.ed. Barcelona: Omega, 2000. 550p.
- STREIT, W.R.; SCHMITZ, R.A. Metagenomics – the key to the uncultured microbes **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 7, p. 492-498, 2004.
- STUBNER, S. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen (TM) detection. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 50, p. 155–164, 2002.
- TAKAYA, N. Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 94, p. 506-510, 2002.
- TAKETANI, R.G.; FRANCO, N.O.; ROSADO, A.S.; VAN ELSAS, J.D. Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 48, p. 7–15, 2010a.
- TANG, K.; KOBAYASHI, R.S.; CHAMPREDA, V.; EURWILAICHITR, L.; TANAPONGPIPAT, S. Isolation and characterization of a novel thermostable neopullulanase-like enzyme from a hot spring in Thailand. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 72, p. 1448-1456, 2008.

TEIXEIRA, L.C.R.S.; PEIXOTO, R.S.; CURY, J.C.; SUL, W.J.; PELLIZARI, V.H.; TIEDJE, J.; ROSADO, A.S. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. **ISME Journal**, New York, v. 4, p. 989–1001, 2010.

THORN, R.G.; REDDY, C.A.; HARRIS, D.; PAUL, E. A. Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 4288–4292, 1996.

TINGRE, S.G.; RUBIN, E.M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 6, p. 805–814, 2005.

TIUNOV, A.V.; SCHEU, S. Facilitative interactions rather than resource partitioning drive diversity functioning relationships in laboratory fungal communities. **Ecology Letters**, Oxford, v. 8, p. 618–625, 2005.

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

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

TRESEDER, K.K. Nutrient acquisition strategies of fungi and their relation to elevated atmospheric CO₂. In: DIGHTON, J.; WHITE, J.F.; OUDEMANS, P.(Ed.). **The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem**, Boca Ration, FL, USA: CRC Press, 2005. p. 713–731.

TRINGE, S.G.; VON MERING, C.; KOBAYASHI, A.; SALAMOV, A.A.; CHEN, K.; CHANG, H.W.; PODAR, M.; SHORT, J.M.; MATHUR, E.J.; DETTER, J.C.; BORK, P.; HUGENHOLTZ, P.; RUBIN, E.M. Comparative metagenomics of microbial communities. **Science**, Washington, v. 308, p. 554–557, 2005.

UCHIYAMA, T.; ABE, T.; IKEMURA, T.; WATANABE, K. Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. **Nature Biotechnology**, New York, v. 23, p. 88–93, 2005

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, p. 616–622, 2009.

VALÁŠKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. **Plant and Soil Environment**, Praha, v. 55, p. 413–423, 2009.

VALE, C.C. **Contribuição ao estudo dos manguezais como indicadores biológicos das alterações geomórficas do estuário do Rio São Mateus (ES)**. 1999. 171p. (Dissertação de Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, 1999.

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

VAN ELSAS, J.D.; DUARTE, G.F.; KEIJZER-WOLTERS, A.; SMIT, E. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 43, p. 133–151, 2000.

VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; KLIRONOMOS, J.N.; URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, London, v. 396, p. 69–72, 1998.

VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; BARDGETT, R.D.; VAN STRAALEN, N.M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, Oxford, v. 11, p. 296–310, 2008.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A., WARD, O.P. (2003) Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, p. 503–549.

VAINIO, E.J.; HANTULA, J. Direct analysis of woodinhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 927–936, 2000.

VASCONCELLOS, S.P.; ANGOLINI, C.F.F.; GARCÍA, I.N.S.; DELLAGNEZZE, B.M.; SILVA, C.C.; MARSAIOLI, A.J.; SANTOS NETO, E.V.; OLIVEIRA, V.M. Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. **Organic Geochemistry**, Washington, v. 41, p. 675–681, 2010.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M.E.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p. 460–468, 2000.

VITTAL, B.P.R.; SARMA, V.V. Diversity and ecology of fungi on mangroves of Bay of Bengal region - An overview. **Indian Journal of Marine Sciences**, New Delhi, v. 35, p. 308–317, 2006.

VOGEL, T.M.; SIMONET, P.; JANSSON, J.K.; HIRSCH, P.R.; TIEDJE, J.M.; VAN ELSAS, J.D.; BAILEY, M.J.; NALIN, R.; PHILIPPOT, L. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. **Nature**, London, v. 7, p. 252, 2009.

VOGET, S.; LEGGEWIE, C.; UESBECK, A.; RAASCH, C.; JAEGER, K.E.; STREIT, W.R. Prospecting for Novel Biocatalysts in a Soil Metagenome. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 6235–6242, 2003.

XU, M.; XIAO, X.; WANG, F. Isolation and characterization of alkane hydroxylases from a metagenomic library of Pacific deep-sea sediment. **Extremophiles**, Berlin, v. 12, p. 255–262, 2008.

ZHENG, Z.; OBBARD, J.P. Polycyclic aromatic hydrocarbon removal from soil by surfactant solubilization and *Phanerochaete chrysosporium* oxidation. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 31, p. 1842–1847, 2002.

ZHENG, Z.; OBBARD, J.P. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal isolates from an oil contaminated refinery soil. **Environmental Science and Pollution Research International**, Landsberg, v. 10, p. 173–176, 2003.

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

ZHU, X.; VENOSA, A.D.; SUIDAN, M.T.; LEE, K. **Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands**. Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency, 2001.

WALDROP, M.P.; ZAK, D.R.; BLACKWOOD, C.B.; CURTIS, C.D.; TILMAN, D. Resource availability controls fungal diversity across a plant diversity gradient. **Ecology Letters**, Oxford, v. 9, p. 1127–1135, 2006.

WALTER, J.; MANGOLD, M.; TANNOCK, G.W. Construction, analysis, and beta-glucanase screening of a bacterial artificial chromosome library from the large-bowel microbiota of mice. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 2347–2354, 2005.

WATLING, R. **Fungal conservation: some impressions – a personal view**. In: DIGHTON, J.; WHITE, J.F.; OUDEMANS, P. (Ed.). **The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem** Boca Ration, FL, USA: CRC Press, 2005. p. 881–896,

WICKER, T.; TAUDIEN, S.; HOUBEN, A.; KELLER, B.; GRANER, A.; PLATZER, M.; STEIN, N. A whole-genome snapshot of 454 sequences exposes the composition of the barley genome and provides evidence for parallel evolution of genome size in wheat and barley. **Plant Journal**, Oxford, v.5 9, p.712-722, 2009.

WIDDEL, F.; RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 12, p. 259–276, 2001.

WHITE, T.J.; BRUNS T.; LEE, S.; TAYLOR , J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In: INNIS, M.A.; GELFAND, D H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York:Academic Press, 1990. p. 315–322.

WOODHOUSE, W.W.; SENECA, E.D.; BROOME, S.W. **Propagation of *Spartina Alterniflora* for substrate stabilization and salt-marsh development**. Fort Belvoir : U.S. Army Coastal Engineering Research Center, 1974. 155p.

YANG, S.Z; JIN, H.J.; WEI, Z.; HE, R.X.; JI, Y.J.; LI, X.M. Bioremediation of Oil Spills in Cold Environments: A Review. **Pedosphere**, Beijing, v. 19, p. 371–381, 2009.

YERGEAU, E.; SANSCHAGRIN, S.; BEAUMIER, D.; GREER, C.W. Metagenomic Analysis of the Bioremediation of Diesel-Contaminated Canadian High Arctic Soils. **Plos One**, Oxford, v. 7,n. 1, 2012.

YING, L.P.W.; JONG, B.C. Application of rDNA-PCR Amplification and DGGE Fingerprinting for Detection of Microbial Diversity in a Malaysian Crude Oil. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 18, p. 815–820, 2008.

YU, K.S.; WONG, A.H.; YAU, K.W.; WONG, Y.S.; TAM, N.F. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v. 51, p. 1071–1077, 2005a.

YUN, J.; KANG, S.; PARK, S.; YOON, H.; KIM, M. J.; HEU, S.; RYU, S. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 7229-7235, 2004.

YUN, T.Y.R.L.; TIAN-LING, Z.; LI-ZHE, C.; XIAO-XING, C.; CHONG-LING, Y. Contamination and potential biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments of Xiamen, China. **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v. 56, p. 1184–1191, 2008.