



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO**

**YARA DIAS DOS SANTOS**

**ESTUDO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASSOCIADAS ÀS ESPÉCIES  
VEGETAIS DO MANGUEZAL DO RIO PACOTI - CE**

**FORTALEZA**

**2017**

**YARA DIAS DOS SANTOS**

**ESTUDO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASSOCIADAS ÀS ESPÉCIES  
VEGETAIS DO MANGUEZAL DO RIO PACOTI - CE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo

Co-orientadora: Profa. Dra. Geórgia Barguil Colares

**FORTALEZA**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S239e Santos, Yara Dias dos.

Estudo das comunidades bacterianas associadas às espécies vegetais do manguezal do Rio Pacoti - CE / Yara Dias dos Santos. – 2017.

52 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

Coorientação: Profa. Dra. Geórgia Barguil Colares.

1. Manguezal. 2. DGGE. 3. Diversidade microbiana. 4. Rio Pacoti. 5. rDNA 16S. I. Título.

CDD 570

---

**YARA DIAS DOS SANTOS**

**ESTUDO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASSOCIADAS ÀS ESPÉCIES  
VEGETAIS DO MANGUEZAL DO RIO PACOTI – CE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Geórgia Barguil Colares  
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

---

Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha mãe, exemplo de força e coragem, luz da minha vida, dedico com amor.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Vânia Melo pela paciência na orientação, incentivo, ensinamentos e repreensões sempre que necessário. Obrigada por ser exemplo de mulher e cientista e tornar possível a conclusão deste trabalho.

Às professoras Geórgia Barguil e Denise Hissa, participantes da banca de avaliação, por toda atenção e por aceitarem participar da minha defesa, é uma honra ter uma banca formada por mulheres fortes e que tão jovens, já conseguiram realizar tanto pela Ciência. À Geórgia, em particular, por ter co-orientado este projeto, pela paciência, compreensão e puxões de orelha.

Aos colegas do LEMBIOTECH, que me foram sempre tão solícitos e me acolheram com carinho. Os dias de trabalho sem dúvida, foram mais agradáveis com vocês por perto.

À Mirella Pereira, técnica de laboratório do LEMBIOTECH, por ter me ajudado tantas vezes e tornado os dias mais felizes com sua simpatia e carinho.

À minha família, por sempre me darem todo o suporte necessário, por acreditarem nas minhas escolhas e estarem sempre ao meu lado. Mãe, é pelo amor sem fim que sinto por você todo esforço e luta.

Ao “Azul de Jezebel”: Danilo Miranda, Heitor Miranda, Ianna Queiroz, Ivna Vasconcelos, Júlia Pereira, Juliana Rodrigues, Lara Mesquita, Larissa Batalha, Leonardo Rogério, Letícia Santiago, Levy Freitas, Marcos Bruno Flor, Pedro Amaral, Raissa Bret, Rodrigo Oliveira, Thyara Costa e Wendell Cavalcante. Inexplicável o quanto sou grata a vocês pelo companheirismo e momentos compartilhados. Que nossos caminhos, por mais que se distanciem, se cruzem em algum ponto dessa caminhada que é a vida. A trajetória na Biologia foi mais feliz com vocês.

À Renan, meu amor, por estar ao meu lado e andar comigo, sempre em frente. Obrigada pelo apoio e pelo aconchego que é compartilhar a vida contigo.

Aos amigos que cultivei na vida, por me darem apoio sempre que preciso, pelas palavras e abraços que me acalentaram tantas vezes, pelas risadas e momentos, muito obrigada.

Aos professores e funcionários do curso de Ciências Biológicas da UFC, que fizeram parte dos meus dias em todos esses anos. Certamente, fui regada por vocês de ensinamentos que levo para a vida.

A todos que, de alguma forma, tornaram esse trabalho possível.

“Quem tem consciência para ter coragem. Quem tem a força de saber que existe. E no centro da própria engrenagem, inventa contra a mola que resiste. Quem não vacila mesmo derrotado. Quem já perdido nunca desespera. E envolto em tempestade, decepado, entre os dentes segura a primavera.”

Secos & Molhados

## RESUMO

Os manguezais são ecossistemas costeiros que, geralmente, encontram-se localizados em áreas urbanizadas e por isso sujeitos a inúmeras pressões antrópicas. A microbiota do solo dos manguezais contribui para a manutenção do equilíbrio e saúde desse ecossistema, através da complexa interação com as espécies vegetais e o seu sedimento. Contudo, apesar do conhecimento dessas relações, pouco ainda se conhece sobre os fatores que as dirigem. Visto isso, este trabalho objetivou contribuir com dados sobre a relação entre as espécies de mangue e as comunidades bacterianas que habitam o solo dos manguezais, também relacionando a estrutura dessas comunidades às variáveis físico-químicas do solo. Esta pesquisa foi realizada em dois períodos, seco e chuvoso, no manguezal do Rio Pacoti, localizado na Região Metropolitana de Fortaleza, capital do Ceará e Nordeste do Brasil. Foram amostrados solo de 7 áreas, 3 com predominância de 1 espécie de mangue isoladamente, sendo as espécies *Avicennia germinans* (A), *Rhizophora mangle* (R) e *Laguncularia racemosa* (L), 2 áreas com mistura de duas espécies (RL e AL), uma área com 3 espécies de mangue juntas (RLA) e uma área controle (C), sem vegetação. No laboratório foram medidas as variáveis ambientais de pH, salinidade, teor de matéria orgânica e percentual de silte-argila do solo. A estrutura das comunidades bacterianas foi acessada por meio da técnica independente de cultivo PCR- DGGE do gene 16S rRNA. Utilizando Análise de Componentes Principais (PCA), foi possível observar que, para os dados abióticos, em ambos os períodos, as áreas RLA e C diferiram das demais que se correlacionaram positivamente. A riqueza de UTOs durante o período seco, que variou entre 33 e 23, foi maior que no período chuvoso, com variação de 22 e 13 UTOs. As áreas que apresentaram maior e menor riqueza no período seco foram AL e C, respectivamente, enquanto no período chuvoso foram as áreas RLA e A. Ao analisar os agrupamentos dos perfis gerados pela DGGE do período seco, observa-se similaridade de 51,9% entre todas as áreas, sendo a maior similaridade do grupo apresentada entre as áreas A e C, com 77,8%. No período chuvoso os agrupamentos mostraram-se diferentes do período seco, onde a maior similaridade, de 67,7%, ficou entre as áreas C e L, além da formação de um grupo 56% similar entre as áreas R, RL e RLA. A análise de redundância foi aplicada às variáveis ambientais e as matrizes de presença/ausência de UTOs, correlacionando-as, no entanto, nenhum dos dados abióticos foi capaz, estatisticamente, de explicar a variação da riqueza de UTOs entre

as áreas. Em conclusão, pode-se inferir que as diferentes espécies de mangue, e suas combinações, influenciam a riqueza das comunidades microbianas que habitam nas proximidades de suas raízes, tendo essa riqueza apresentado diferença também entre os períodos estudados, para todas as áreas.

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

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.2. Caracterização dos manguezais e impactos.....	13
2.3. Vegetação, zonação e interação micro-organismo – hábitat.....	15
2.4. Métodos de estudo de micro-organismos.....	17
3. OBJETIVOS.....	20
3.2. Objetivo Geral.....	20
3.3. Objetivos Específicos.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.2. Área de estudo.....	21
4.3. Amostragem e Pontos de coleta.....	21
4.4. Análises físico-químicas.....	22
4.5. Extração de DNA.....	23
4.6. PCR-DGGE.....	23
4.7. Análise de dados.....	24
5. RESULTADOS.....	25
6. DISCUSSÃO.....	39
7. CONCLUSÃO.....	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

## 1. INTRODUÇÃO

Os manguezais são ecossistemas únicos, caracterizados pela alta produtividade, grande quantidade de matéria orgânica, que é constantemente reciclada, e por ocorrerem na interface entre o oceano e os habitats terrestres (NEDWELL; BLACKURN; WIEBE, 1994). O Brasil possui a segunda maior área de manguezal do mundo, com 13.000 Km<sup>2</sup> (SPALDING *et al.*, 2010).

As florestas de mangue são ameaçadas constantemente por atividades realizadas pelo homem, que podem gerar danos, direta ou indiretamente, e conseqüentemente, alterar sua estrutura e distribuição. Os impactos antrópicos se tornam a principal causa de distúrbios, devido ao desmatamento, poluição e barragem de rios, desenvolvimento dos portos e indústrias, especulação imobiliária, aquicultura e agricultura, entre outros danos (AUBÉ; CARON, 2001). Sobre a severidade dos impactos causados pelo homem, Holguin *et al.* (2001), considera que se a taxa de destruição prosseguir da mesma forma, em 50 anos os manguezais desaparecerão.

A interação entre os micro-organismos e as plantas deve ser vista com atenção em casos de preservação e restauração de áreas de manguezais, principalmente quando encontrados em climas áridos. Isso porque a regeneração das florestas de mangue de climas áridos, quando comparada aos manguezais dos trópicos, não ocorre tão facilmente apenas com o plantio de propágulos, é um processo que ocorre lentamente devido ao difícil acesso à água doce. Bashan *et al.* (2002), utilizou-se de bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB, do inglês *Plant growth-promoting bacteria*), extraídas de manguezais como ferramenta no auxílio do reflorestamento de uma área de mangue impactado.

Bactérias e arqueias já foram isoladas desse ambiente, sabe-se que as comunidades desses micro-organismos não se relacionam apenas com a composição vegetal, mas também com variáveis ambientais, como a granulometria (COLARES; MELO, 2013) e matéria orgânica do sedimento. No entanto, ainda se conhece muito pouco das relações complexas que ocorrem nesse ecossistema, de como se dá a atividade dos micro-organismos, suas funções, o que os influencia e a composição dessas comunidades. Assim, fica clara a necessidade de estudos que elucidem os processos complexos que ocorrem nos manguezais, assim como as comunidades microbianas associadas a ele, que além de essenciais na restauração, apresentam grande potencial biotecnológico.

Neste trabalho foi realizado um estudo sobre as bactérias que habitam o solo de diferentes espécies vegetais, assim como áreas com misturas dessas espécies, no Manguezal do Rio Pacoti, Ceará, região nordeste de Brasil. O objetivo da pesquisa foi contribuir com dados a respeito da riqueza bacteriana do sedimento, durante a época seca e chuvosa, buscando encontrar diferenças na distribuição desses micro-organismos e desvendar quais fatores dirigem essa diferença.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Caracterização dos manguezais e impactos

Manguezais são ecossistemas únicos, encontrados na zona de transição entre os ambientes terrestre, marinho e dulcícola (ALONGI, 2002). Localizados em regiões tropicais e subtropicais, as florestas de mangue são caracterizadas por sua alta produtividade, grande quantidade de matéria orgânica, que é constantemente reciclada, pelo seu sedimento inconsolidado e com pouca oxigenação, salinidade elevada e por estarem sob influência das marés, sendo inundadas constantemente (NEDWELL; BLACKURN; WIEBE, 1994). A matéria orgânica encontrada nesse ambiente, proveniente em grande parte de material foliar, forma a base alimentar de muitos organismos que vivem nas águas costeiras, como moluscos, crustáceos e peixes. Além disso, os manguezais servem como berçário para diversas espécies, bem como área de forrageio para aves, abrigo para alguns répteis, pequenos mamíferos e invertebrados (FLORES-VERDUGO, 1990; SCHAEFFER-NOVELLI, 2000). Essas áreas não beneficiam apenas a fauna, mas atuam também como barreira na proteção da costa contra erosão, em áreas de ocorrência de tsunamis, tempestades, ciclones tropicais e elevação do nível do mar (ALLEN, 2001; LEE *et al.*, 2014).

Três quartos da área costeira do mundo são ocupados por manguezais, entre 35°N e 40°S (GIRI *et al.*, 2011), estando presente na costa de 123 países (Feller *et al.* 2010). O sul da Ásia engloba 33,5% dos manguezais do mundo, seguido pelos 15,7% da América do Sul (SPALDING *et al.*, 2010). No Brasil, esse ecossistema se estende desde o extremo norte do Amapá, até o litoral sul de Santa Catarina (MAIA *et al.*, 2006), com aproximadamente 1,38 milhões de hectares (13.800 Km<sup>2</sup>), correspondendo a 50% da área total de manguezais das Américas (KJERFVE; LACERDA, 1993).



## 2.2. Vegetação, zonação e interação micro-organismo – hábitat

A vegetação dos manguezais, denominada mangue, possuem características morfológicas, ecofisiológicas e adaptações que permitem seu desenvolvimento nesse ambiente (DUKE ALLEN, 2006). Essa vegetação é representada por 9 ordens, 20 famílias, 26 gêneros e cerca de 70 espécies (SPALDING, 1997), onde 17 delas são exclusivas desse ecossistema (DUKE et al., 1998). No Brasil, cinco espécies de mangues são representativas, sendo elas: *Rhizophora mangle* L., *Avicennia schaueriana* Stapf. & Leech, *A. germinans* L., *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn e *Conocarpus erectus* L. (CINTRÓN & SCHAEFFER-NOVELLI, 1992; KJERFVE & LACERDA, 1993).

Os mangues são um tipo de vegetação arbórea tolerantes a salinidade, adaptados ao ambiente inundável e com pouca oxigenação (SCHAEFFER-NOVELLI, 2002). Os gêneros *Avicennia* e *Laguncularia* possuem glândulas de sal que permitem a eliminação do excesso de sal, assim como possuem pneumatóforos, estruturas que possibilitam as trocas gasosas durante a maré baixa (CANTERA & ARNAUD, 1997). Em *Rhizophora mangle* pode-se observar as “raízes-escora”, que auxiliam a sustentação no sedimento inconsolidado (DUKE, 2002). Além disso, os propágulos de espécies típicas de mangue, podem ser dispersos por flutuação (hidrocoria).

A distribuição das espécies de mangue se dá, em grande parte dos manguezais do mundo, na ocorrência de padrões de bandas dessas espécies, onde, normalmente, ocorrem do litoral seguindo para o continente, ou na forma de bandas de uma única espécie paralela a costa. Essa variação ocorre em diferentes escalas, podendo variar de um manguezal para outro, assim como dentro de um mesmo estuário, estando intimamente ligada as distintas inundações pelas marés, a capacidade de tolerância de cada espécie à salinidade, as propriedades físico-químicas do solo, entre outros fatores (BUNT, 1996; HOGARTH, 2010; YUVARAJ *et al.*, 2017).

Essa zonação em manguezais é um fator chave para a determinação e manutenção da produtividade e biomassa desse ecossistema, sendo também fator controlador da fauna que interage com essas áreas (KOMIYAMA *et al.*, 2007;

KRAUSE *et al.*, 2004). Como essa zanação ocorre em florestas de mangue é muito complexa, e vários fatores são apontados como direcionadores desses padrões, entre eles a geomorfologia do local, salinidade, marés, entrada de água doce, competição interespecífica e dispersão e predação distinta para os propágulos (MCKEE, 1995; TAM *et al.*, 1997).

A vegetação, o solo e os micro-organismos se relacionam intimamente, de forma a influenciarem e serem influenciados uns pelos outros. Nos manguezais os micro-organismos atuam reciclando os nutrientes e conservando-os no ecossistema, o que explica o fato de que apesar das florestas de mangue serem pobres em nutrientes, tais como nitrogênio, carbono, enxofre e fósforo, ainda assim são consideradas ambientes altamente produtivos (ALONGI *et al.*, 1993; VAZQUEZ *et al.*, 2000). As folhas e outros materiais provenientes das plantas, são degradados no solo, primeiramente, pelos micro-organismos e depois pelos organismos maiores do ambiente (ALONGI *et al.*, 1989; HOLGUIN *et al.* 2001). Com 91% da biomassa total do solo de manguezais tropicais, bactérias e fungos desempenham atividades microbianas essenciais nesse ecossistema, principalmente as bactérias, que desempenham funções chave nos ciclos do nitrogênio, participando de todas as transformações desse nutriente, ciclo do carbono, redução de sulfato, oxidação do enxofre, entre outras atividades. (ABRAHAM *et al.*, 2004; ALONGI, 2002; BHARATHI *et al.*, 1991).

As raízes das espécies de mangue, por sua vez, podem formar uma rede complexa próxima a superfície do sedimento, influenciando as características do solo, criando microhabitats, que são colonizados por diversos micro-organismos (VAZQUEZ *et al.*, 2000). Essa poção do solo em contato com as raízes é denominada rizosfera, onde os exsudatos das raízes influenciam diretamente na riqueza, composição e abundância da microbiota do sedimento (efeito rizosférico).

Estudar as relações entre os micro-organismos, as plantas e os nutrientes do solo, é essencial para se entender o funcionamento de vários ecossistemas. Nos manguezais, onde o solo é inundado constantemente, a relação entre esses três componentes poderia não influenciar tão fortemente um ao outro, principalmente na modulação das comunidades microbianas pela vegetação.

Colares e Melo (2013), num estudo com a rizosfera de *R. mangle*, encontram a correlação entre comunidades de arqueias e bactérias de três pontos distintos em um manguezal, com a granulometria do solo. Apesar da diferença entre os pontos de amostragem, foi encontrada uma similaridade de 30% entre eles, o que pode ser explicado pelo fato de todas as áreas estarem sob influência de uma mesma espécie de mangue, corroborando com a hipótese de que uma microbiota específica é selecionada pelas raízes das espécies vegetais, e que essa seleção também ocorre nas áreas de manguezais.

Utilizando técnicas moleculares, Gomes *et al.* (2014) estudaram as comunidades microbianas da rizosfera de duas espécies de mangue, *A. shaueriana* e *L. racemosa* e de uma área sem vegetação e encontraram que *Rhizobiales* e *Vibrionales* ocorriam em maior abundância nas áreas de rizosfera, enquanto bactérias redutoras de sulfato, das ordens *Desulfobacterales* e *Desulfomonadales*, ocorreram em maior abundância na rizosfera de *A. shaueriana*.

Apesar de se conhecer a importância da relação entre os micro-organismos e seu ambiente, ainda se conhece pouco sobre como essas relações ocorrem e o que as dirige, havendo uma necessidade de estudos que contribuam para desvendar o papel dos micro-organismos nos manguezais, como as espécies vegetais e seu sedimento influenciam a riqueza e abundância dessas comunidades microbianas, e por fim, como utilizar essas interações em projetos de reflorestamento em áreas de manguezal impactados.

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

Acessar as inúmeras e complexas comunidades microbianas que habitam diferentes ecossistemas, foi, por muito tempo, um desafio para os microbiologistas (TORSVIK *et al.*, 2002). No entanto, essa abordagem começou a mudar não faz muito tempo. Há cerca de 30 anos, foi constatado que não se poderia obter a diversidade total de um ambiente através do seu cultivo em culturas puras, assim como essas técnicas dependentes de cultivo são capazes de capturar apenas 1% das células observadas em contagem direta, esse fenômeno ficou conhecido como “a grande

anomalia da contagem de placas”. (HANDELSMAN, 2004; STALEY; KONOPKA, 1985; TORSVIK; ØVREÅS, 2002). Isso se deve, principalmente, a dificuldade na reprodução do ambiente natural no qual os micro-organismos estão crescendo, como também das complexas interações entre essa microbiota, tornando o que se encontrava nas técnicas tradicionais não representativa da diversidade encontrada originalmente. (SCHIMIDT, 2006).

As técnicas independentes de cultivo são aquelas que se baseiam na informação retirada dos componentes celulares diretamente do ambiente, sem haver a necessidade de cultivo (MALIK *et al.*, 2008).

Essas técnicas moleculares envolvem, em grande parte, a utilização do gene que codifica para a subunidade menor do RNA ribossômico (16S rRNA). O rRNA 16S foi, e ainda é, utilizado em larga escala para estudos moleculares por suas características, que permitem comparações filogenéticas, com uma maior facilidade de sequenciamento. Entre essas características, podemos citar o seu tamanho, de aproximadamente 1600 nucleotídeos, sendo intermediário entre o 5S rRNA e o 23S rRNA; ele pode ser encontrado em todos os procariotos; possui longas regiões conservadas; possui regiões hipervariadas, utilizadas como marcadores genéticos, usados frequentemente para explorar a diversidade e estrutura de comunidades microbianas. (MUYZER; RAMSING, 1995; SPIEGELMAN *et al.*, 2005; WOESE *et al.*, 1990).

A reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), é uma técnica na qual cópias de um gene de interesse são geradas em um curto espaço de tempo, e é a base de inúmeros métodos que se utilizam desse material genético amplificado. A PCR consiste na hibridização de dois iniciadores, que se ligam em regiões específicas do gene-alvo, fazendo uma extensão cíclica da região que se deseja amplificar, com ciclos de desnaturação da cadeia e anelamento, em temperaturas específicas, gerando, assim, cópias da região onde os iniciadores se ligaram.

Entre as chamadas técnicas de *fingerprinting*, que utilizam o DNA amplificado na PCR, o DGGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante), é uma, dentre várias, a ser utilizada para obter informações sobre perfis de comunidades

microbianas. Através de PCR-DGGE, é possível se obter dados relativos a composição, estrutura e diversidade da microbiota de determinada área (MUYZER *et al.*, 1993; TORSVIK; ØVREÅS, 2002).

A PCR-DGGE consiste na separação do DNA amplificado, não através do tamanho da molécula, mas sim por sua composição nucleotídica. Em posse das cópias dos fragmentos do DNAr 16S, submete-se essas cópias a um gradiente desnaturante de ureia e formamida, num gel de poliacrilamida, que rompe as pontes de hidrogênio entre as cadeias, não desnaturando completamente, pois um dos iniciadores da PCR possui um grampo G-C (região rica no conteúdo dessas bases). A migração por conta da desnaturação diferenciada de cada fragmento, gera um perfil de bandas que caracteriza cada comunidade (MUYZER *et al.*, 1993).

As bandas encontradas na DGGE são chamadas UTOs (unidades taxonômicas operacionais), e delas são gerados dados para comparação das diferentes comunidades através de matrizes de similaridade e análises estatísticas multivariadas (NAKATSU, 2007).

### **3. OBJETIVOS**

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

Este trabalho teve como objetivo contribuir com dados sobre a estrutura das comunidades bacterianas que habitam o solo dos manguezais, buscando elucidar relações entre essas comunidades e as diferentes espécies de mangue. Com isso procura-se subsidiar futuros projetos bem-sucedidos de reflorestamento e plantio de mangue.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Aplicar a técnica de DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) para obtenção dos perfis de riqueza dos ribotipos de cada ponto de coleta;
- Verificar a ocorrência de variações na estrutura das comunidades bacterianas entre os pontos e entre os períodos de coleta (seco e chuvoso);
- Acessar as variáveis ambientais de pH, salinidade, matéria orgânica e conteúdo de silte-argila do solo, relacionando a ocorrência dos micro-organismos com esses fatores.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Área de estudo

O Rio Pacoti é um dos mais importantes recursos hídricos dessa região. O rio banha os municípios de Pacoti, Redenção, Acarape, Pacajús, Guaíuba, Horizonte, Itaitinga, Fortaleza, Eusébio e Aquiraz (IPLANCE, 2002), possuindo 15 km de extensão e 160 hectares de manguezais.

Essa área passou a ser legalmente protegida desde o ano 2000, pelos Decretos Estaduais 25.777 e 25.778, onde foi criada a Unidade de Conservação Estadual “Corredor Ecológico do Rio Pacoti” e a APA do Rio Pacoti, abrangendo os municípios de Aquiraz, Fortaleza e Euzébio (CEARÁ, 2000). GORAYEB et al., 2005, destacou que apesar do estuário do Rio Pacoti ser uma área protegida, muitos impactos são observados principalmente pelo mau uso dos recursos hídricos, pela atividade turística e imobiliária, o desmatamento das espécies de mangue, causando erosão e assoreamento e conseqüentemente uma diminuição drástica da biodiversidade local.

Quanto à composição vegetal, o manguezal do Rio Pacoti possui cinco espécies predominantes de mangue, sendo elas *Avicennia germinans* (mangue preto), *Avicennia schaueriana* (mangue siriúba), *Laguncularia racemosa* (mangue branco), *Rhizophora mangle* (mangue vermelho) e *Conocarpus erectus* (mangue botão) (NASCIMENTO, 2003).

### 4.2. Amostragem e Pontos de Coleta

Foram realizadas duas coletas, uma no mês de Novembro de 2014, durante o período seco, e outra no mês de Fevereiro de 2015, durante o período chuvoso. Para tanto, foram determinadas 7 áreas de amostragem com combinações diferenciadas ou isoladas de 3 diferentes espécies de mangue, sendo elas *R. mangle* (**R**), *A. germinans* (**A**), *L. racemosa* (**L**), uma área com combinação das três espécies (**RLA**) e áreas com combinações de duas espécies (**RL e AL**), além de uma área controle (**C**) sem vegetação. Dessas áreas foram feitos quadrantes, com ajuda de uma fita métrica, de 25m<sup>2</sup> e dentro de cada uma foram divididos mais 25 subquadrantes e entre eles foi escolhido, de forma aleatorizada, os subquadrantes para a coleta do

sedimento superficial (0-10 cm), com a ajuda de um amostrador cilíndrico de PVC (core) de 30 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro. A parte mais superficial do solo foi acondicionada em frascos estéreis, devidamente identificados, em 5 replicatas de cada área, colocados em recipiente térmico com gelo e levados posteriormente ao laboratório, onde foram mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Essas amostras foram destinadas às análises moleculares. Já o restante do solo contido no core foi colocado separadamente em sacos plásticos e foram destinados às análises físico-químicas. Ao final da coleta foram totalizadas 35 amostras.

Figura 2. Localização dos pontos de coleta no manguezal do Rio Pacoti – CE.



Fonte: Google Earth. Disponível em: < <https://www.google.com.br/intl/pt-PT/earth/>>. Acesso em Junho de 2017.

#### 4.3. Análises físico-químicas

Foi retirado um pool de 100g dos solos para centrifugação a 10.000g, por 5 minutos, para a retirada da água intersticial, da qual foi medido o pH com a ajuda de um potenciômetro e a salinidade com um refratômetro. Outra parte do solo foi seca em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  por 48h para quantificação do teor de matéria orgânica e silte-argila.

Quando completamente secas, as amostras foram maceradas com grau e pistilo, tendo o cuidado de peneirar para a retirada de pequenos fragmentos das raízes. Para a quantificação do teor de matéria orgânica foram utilizados cadinhos, postos anteriormente no dessecador para que fossem mantidos sem umidade. Os cadinhos foram pesados, sendo eles manuseados com uma pinça, o valor anotado e adicionado 0,5 g do solo, em triplicatas. As amostras foram colocadas em mufla a 550°C, por 4 horas e só foram retiradas após esfriarem. Os cadinhos foram pesados novamente e o teor de matéria orgânica calculado pela fórmula  $M.O. (g/Kg) = [(Mi - Mf)/Mi] * 1000$ , na qual M.O. é a matéria orgânica, Mf é a massa após combustão e Mi, a massa inicial. O método utilizado é o de perda de peso por ignição (PPI), descrito por Schulte e Hopkins (1996). A quantificação da fração de silte-argila foi feita a partir da lavagem de 100g do solo em peneira de abertura de 0,062 mm, em triplicata para cada amostra. Os frascos foram postos em estufa a 60°C para a secagem. Os cálculos são feitos a partir da diferença de peso inicial e peso final do conteúdo dos frascos.

#### **4.4. Extração de DNA**

O DNA foi extraído individualmente de cada amostra (35 amostras), usando o kit comercial PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation (MO BIO, EUA), de acordo com o manual que o acompanha. Basicamente, deve-se pesar 0,25 g de solo e adicioná-los a microtubos contendo pequenas esferas e adicionar também uma solução contendo SDS (do inglês sodium dodecyl sulfate), que juntos serão responsáveis pela lise física e química da célula. Nos passos que seguem, o DNA genômico de cada amostra é capturado em uma membrana de sílica. No último passo, o DNA presente na membrana é lavado e, em seguida, eluído utilizando 100 µL de água estéril livre de DNase. O DNA extraído foi quantificado por absorbância (NanoDrop) e as amostras de DNA armazenadas a -20 °C.

#### **4.5. PCR-DGGE**

Primeiramente, por meio de PCR, foi realizada a amplificação da região hipervariável V3 do 16S rRNA (ØVREAS et al., 1997), utilizando os iniciadores específicos para essa região, 338F GC (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA 3') e 518R (5' ATT ACC

GCG GCT GCT GG 3'). A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). As condições da PCR utilizadas para o domínio Bacteria foram as seguintes: 95°C por 5 min, 30 ciclos de 92°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, e um período de extensão final a 72°C por 10 min. Em todas as reações foram usadas concentrações de DNA entre 10 e 20 ng/ul. Esse valor corresponde a um volume de 1µl. Todas as reações foram de 25 uL e continham: 0,5 pmol de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, 2,5 µl de tampão de PCR 10 × (100 mM Tris - HCl e KCl 500 mM, pH 9,0), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM e 5U de Taq DNA polimerase e água ultrapura Milli-Q esterilizada para atingir o volume final. Os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com SYBR Safe (Invitrogen), em tampão TBE 0,5 x (45 mM de Tris base, 45 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA pH 8,0), utilizando um sistema de fotodocumentação ultravioleta. O marcador molecular de 1 Kb foi utilizado como padrão de tamanho de DNA. Os amplicons gerados foram separados por DGGE. Os géis de acrilamida 8% foram preparados com gradientes desnaturantes de 40% a 70%, usando uma solução desnaturante 100% (7M uréia e 40% formamida) e uma solução 0% (sem uréia e formamida). A eletroforese foi realizada a 60°C e a 200V constantes por 16h, em um sistema DCode (BioRad), utilizando a solução tampão TAE 0,5X. Após a eletroforese, o gel foi imerso em solução de SYBR-Green I (Molecular Probes) na concentração de 1:10.000 (v/v) por 1h. A imagem do gel foi capturada em um sistema de fotodocumentação ultravioleta (UVP).

#### **4.6. Análise dos Dados**

Análise de Componentes Principais (PCA) foi usada para discriminar padrões gerais de variáveis ambientais entre todas as amostras utilizando o programa PAST 2.12 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Foi utilizada a plataforma GelCompar II para rodar o programa BioNumerics (Applied Maths, Bélgica) versão 7.1, no qual foi feita a normalização, comparação e conversão das imagens dos géis de DGGE em matrizes de abundância e presença/ausência, das quais foram originados os agrupamentos hierárquicos usando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade de Jaccard. As matrizes geradas pelo BioNumerics também foram utilizadas para correlacionar a ocorrência das espécies com os dados ambientais por meio da análise de redundância (RDA), usando Canoco versão 4.5 (Biometris, Wageningen, Holanda).

## 5. RESULTADOS

Os valores das variáveis ambientais de pH e salinidade das amostras coletadas durante período seco e chuvoso estão correlacionados na seguinte tabela. As amostras estão representadas pelas seguintes letras R, RL, RLA, A, AL, L e C, que significam áreas de *R. mangle*; *R. mangle* e *L. racemosa*; *R. mangle*, *L. racemosa* e *A. germinans*; *A. germinans*; *L. racemosa*; Controle (sem vegetação), respectivamente.

Tabela 1. Variáveis ambientais de pH e salinidade dos pontos de coleta nos períodos seco e chuvoso.

Pontos	Período	Ph	Salinidade
R1	Seco	6,64	55
R2	Chuvoso	6,66	53
RL1	Seco	6,45	53
RL2	Chuvoso	6,33	57
RLA1	Seco	7,18	49
RLA2	Chuvoso	6,43	49
A1	Seco	7,12	60
A2	Chuvoso	6,45	90*
AL1	Seco	6,56	61
AL2	Chuvoso	6,43	57
L1	Seco	7,02	64
L2	Chuvoso	6,93	50
C1	Seco	7,4	37
C2	Chuvoso	7,5	37

Observando a tabela acima, podemos observar que o pH apresenta pouca variação entre as áreas e também entre os períodos, com valores entre 6,33 e 7,5, onde nessa faixa pode ser considerado de ácido a neutro. Quanto a salinidade, os valores também não apresentaram grandes variações, destoando apenas no ponto A2, correspondente ao período chuvoso. De uma forma geral, os valores de salinidade podem ser considerados elevados em ambos os períodos, não tendo apresentado diminuição significativa entre as coletas.

Os valores de matéria orgânica (M.O) e conteúdo de silte-argila, referente ao período seco e chuvoso, respectivamente, assim como suas triplicatas, estão demonstrados nas tabelas 2 e 3 abaixo.

Tabela 2. Variáveis ambientais de Matéria orgânica e Silte + Argila dos pontos de coleta, em triplicata, referente ao período SECO.

<b>Pontos</b>	<b>M.O.(g/kg)</b>	<b>Média</b>	<b>Silte - Argila (%)</b>	<b>Silte - Argila (Média)</b>
R1	51,01		40,82	
R2	50,57	49,93	33,2	38,26
R3	48,21		40,77	
RL1	35,25		40,83	
RL2	33,17	34,93	50,97	44,82
RL3	36,37		42,68	
RLA1	37,19		19,31	
RLA2	40,79	38,79	20,33	20,28
RLA3	38,39		21,20	

A1	40,77		23,32	
A2	47,06	45,83	23,68	23,55
A3	49,66		23,65	
AL1	59,71		35,42	
AL2	48,20	51,95	34,44	35,53
AL3	47,94		36,74	
L1	64,93		50,95	
L2	70,01	67,32	50,61	50,19
L3	67,01		49,02	
C1	14,18		11,31	
C2	15,04	14,80	8,91	11,97
C3	15,18		15,7	

Tabela 3. Variáveis ambientais de Matéria orgânica e Silte + Argila dos pontos de coleta, em triplicata, referente ao período CHUVOSO.

<b>Pontos</b>	<b>M.O.(g/kg)</b>	<b>Média</b>	<b>Silte + Argila (%)</b>	<b>Silte + Argila (média)</b>
R1	54,36		27,7	
R2	41,50	47,95	26,27	26,47
R3	48,0		25,45	

RL1	54,95		32,56	
RL2	54,37	54,24	32,74	32,41
RL3	53,40		32,83	
RLA1	27,21		12,09	
RLA2	28,53	27,68	11,94	12,25
RLA3	27,30		12,74	
A1	34,68		33,95	
A2	33,89	32,70	36,38	35,52
A3	29,54		36,24	
AL1	40,54		40,33	
AL2	36,97	39,47	39,83	40,14
AL3	40,89		40,26	
L1	44,16		45,99	
L2	46,64	45,88	45,16	45,13
L3	46,85		44,29	
C1	20,31		17,24	
C2	17,38	19,34	16,48	17,4
C3	20,34		18,48	

O teor de matéria orgânica, entre os períodos, não apresentou uma grande variação, como podemos observar no Gráfico 1 abaixo. Não se pode observar um padrão de aumento no teor de matéria orgânica durante o período chuvoso na maioria dos pontos, apenas em RL2 e C2. Dentre todas as áreas de amostragem, a L2 apresentou o maior teor de M.O., com 67,23 g/kg, e C2 o menor, com 19,34, sendo ambas no período chuvoso. O conteúdo de silte-argila também não mostrou grande

variação entre os dois períodos (Gráfico 2). Entre as áreas, L1 e RLA2, obtiveram maior e menor porcentagem de silte-argila, respectivamente.

Gráfico 1. Média e desvio padrão do teor de matéria orgânica (g/kg) das triplicatas do período seco e chuvoso.

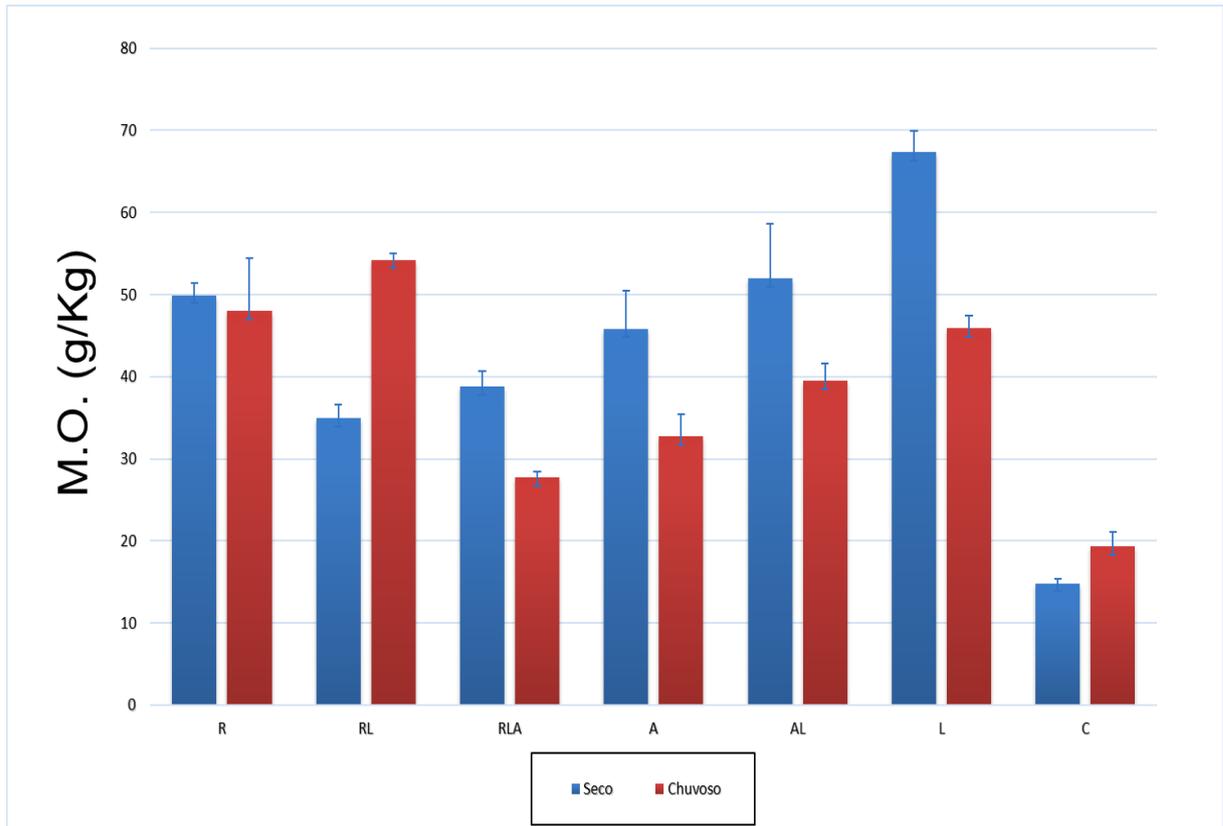
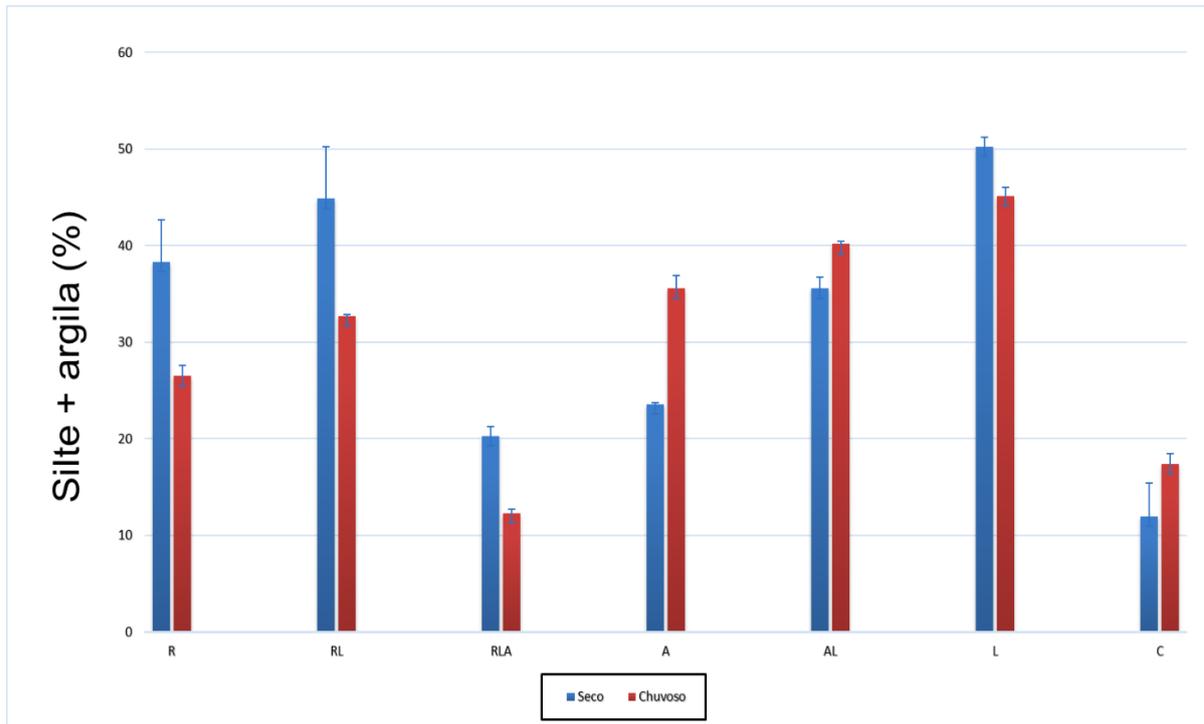


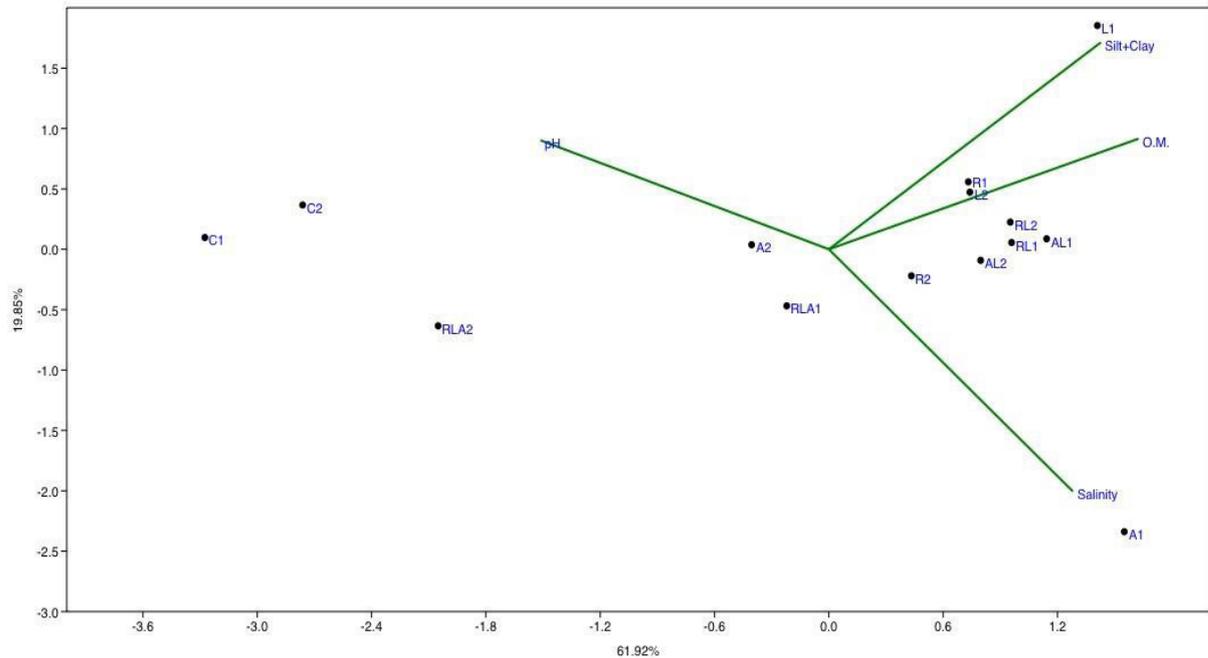
Gráfico 2. Média e desvio padrão do conteúdo de silte+argila das triplicatas do período seco e chuvoso.



O teor de matéria orgânica, entre os períodos, não apresentou uma grande variação, como podemos observar no Gráfico 1. Não se pode observar um padrão de aumento no teor de matéria orgânica durante o período chuvoso na maioria dos pontos, apenas em RL2 e C2. Dentre todas as áreas de amostragem, a L2 apresentou o maior teor de M.O., com 67,23 g/kg, e C2 o menor, com 19,34, sendo ambas no período chuvoso. O conteúdo de silte-argila também não mostrou grande variação entre os dois períodos (Gráfico 2). Entre as áreas, L1 e RLA2, obtiveram maior e menor porcentagem de silte-argila, respectivamente.

Para a análise da variabilidade dos dados ambientais obtidos, foi utilizada a análise de componentes principais (PCA). O componente principal 1 explicou 61,92% da variabilidade dos dados, enquanto o componente 2 explicou 19,85%, explicando, juntas, mais de 80% da variabilidade total do conjunto de dados das duas coletas. Com o componente principal 1, se correlacionaram positivamente, a salinidade, matéria orgânica e silte-argila, assim como os pontos que apresentaram os maiores valores dessas variáveis. Com o componente principal 2 dois se relacionaram positivamente os pontos C1, C2, RLA2 e pH.

Figura 3. Análise de PCA demonstrando a variabilidade entre as 7 áreas em ambos os períodos, seco e chuvoso.

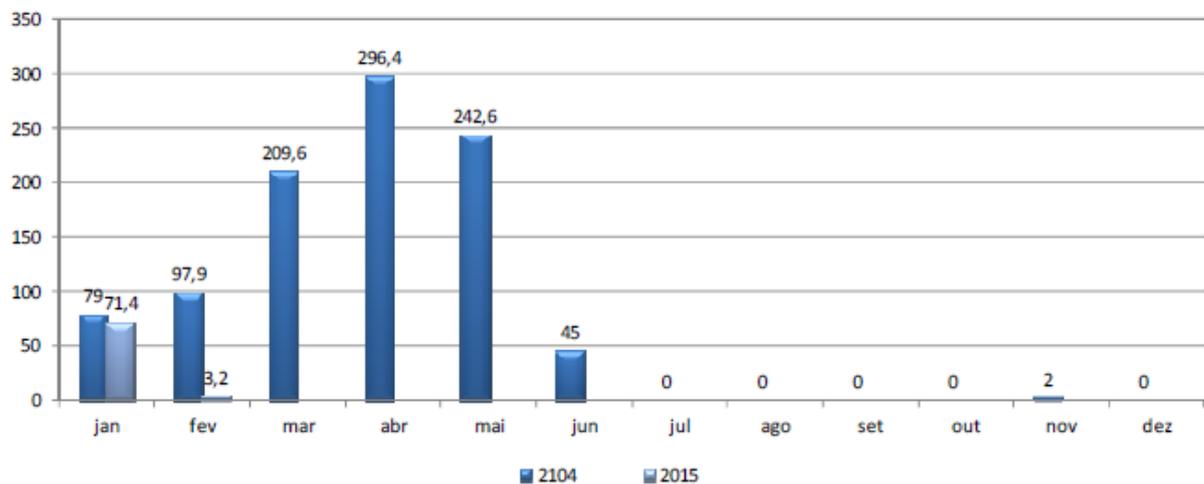


As bandas dos perfis gerados pela DGGE, quando contabilizadas, permitem a estimativa da riqueza de ribotipos de uma amostra. Observando os dados da Tabela 2, pode-se notar uma diminuição considerável na quantidade de bandas no período chuvoso, que variou de 13 a 22, enquanto que o período seco mostrou variação de 23 a 33 bandas. As áreas AL, L e RL, no período seco, tiveram a maior riqueza e a área C a menor. No período chuvoso, a área RLA, com 22 bandas, mostrou a maior riqueza para essa época, e com apenas 13 bandas, a área A apresentou a menor riqueza. Além desses dados, verifica-se que os pontos que apresentaram maior riqueza de ribotipos, tiveram a presença em comum da espécie *L. racemosa*. O ponto C mostrou a menor variação entre os períodos, com uma diferença de apenas 14 bandas, enquanto as demais variaram de 6 a 17.

Tabela 3. Riqueza de ribotipos de Bacteria detectado por DGGE.

	<b>R</b>	<b>RL</b>	<b>RLA</b>	<b>A</b>	<b>AL</b>	<b>L</b>	<b>C</b>
<b>Seco</b>	27	30	28	25	33	33	23
<b>Chuvoso</b>	15	15	22	13	16	16	19

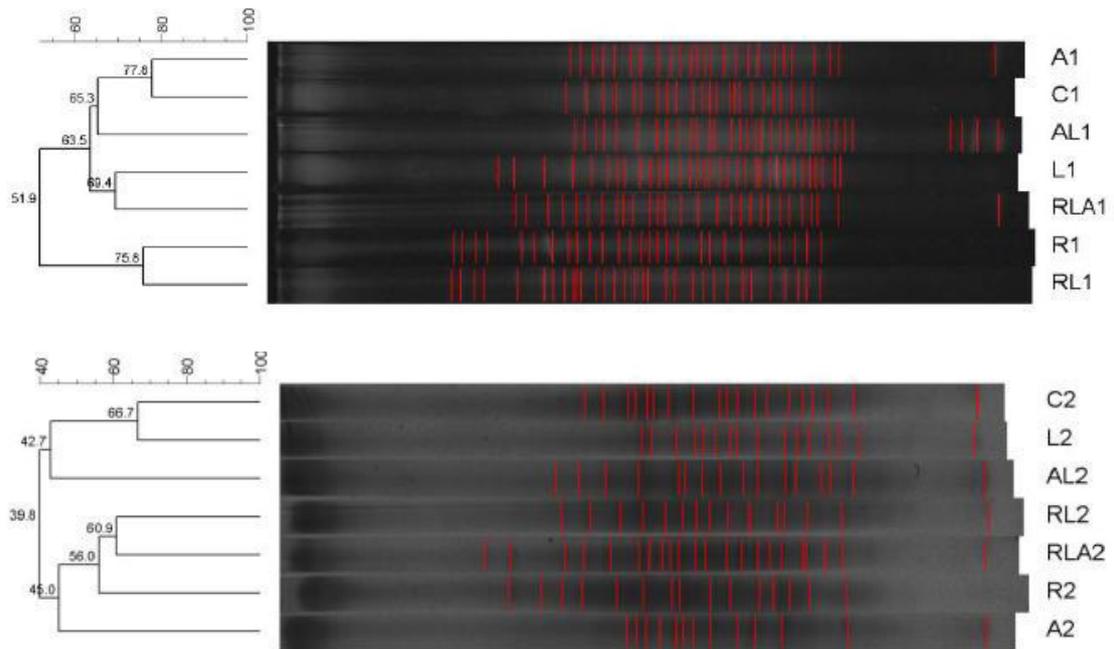
Figura 4. Gráfico de chuvas nos períodos de coleta.



Fonte: FUNCEME. Disponível em: <http://www.funceme.br/index.php/areas/23monitoramento/meteorol%C3%B3gico/406-chuvas-di%C3%A1rias>. Acesso: maio, 2017.

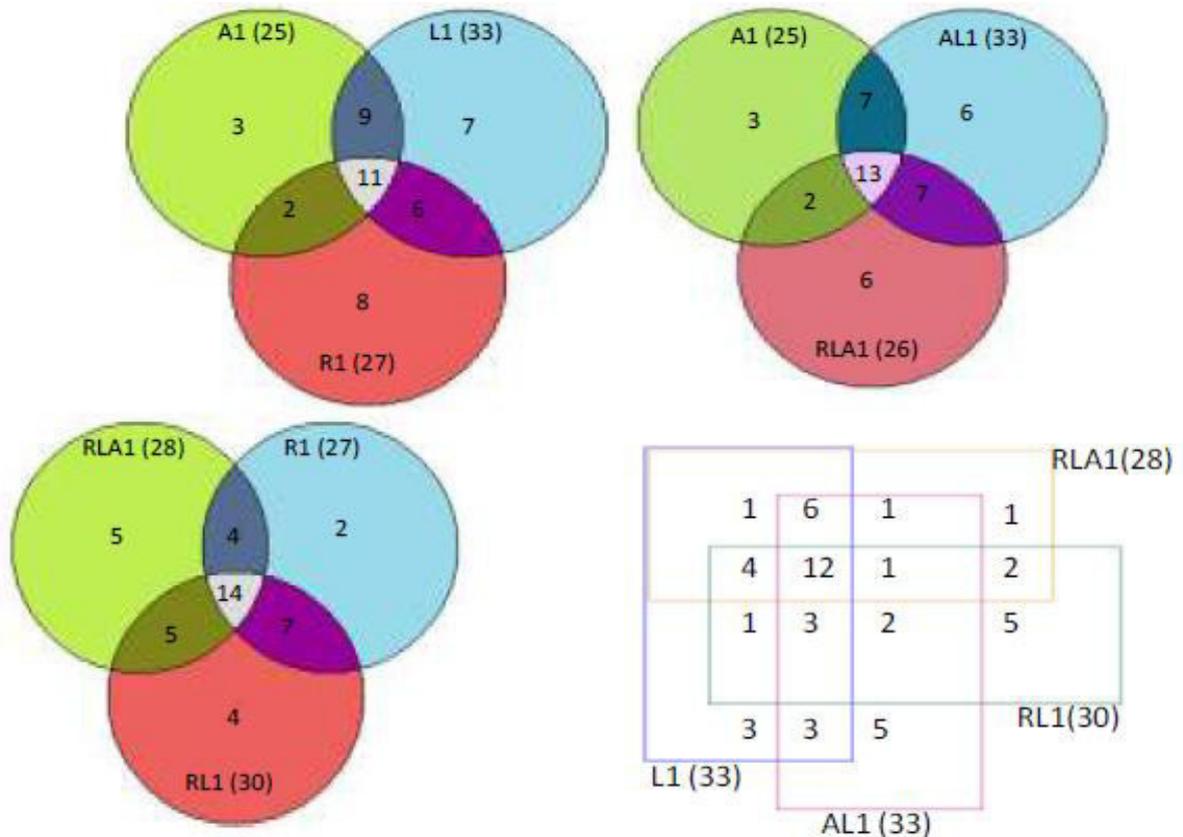
Analisando os agrupamentos derivados dos perfis da DGGE (Figura 4.), pode-se observar que as áreas se agruparam de forma distinta entre os dois períodos. Entre as áreas da coleta 1, as que apresentaram maior percentual de similaridade, com 77,8%, foram A e C, seguidas por R e RL, com 75,8%. Contudo, na coleta 2, as áreas que apresentaram maior percentual de similaridade, foram L e C, com 66,7%, seguidas por RL e RLA, com 60,9%. Observa-se, também, que durante o período chuvoso formou-se um grupo com os pontos R, RL e RLA com 56% de similaridade.

Figura 4. Agrupamentos em função das estruturas de comunidades de bactérias obtidas a partir dos perfis de DGGE utilizando o algoritmo UPGMA e a distância de Jaccard. Coletas 1 (período seco) e 2 (período chuvoso).



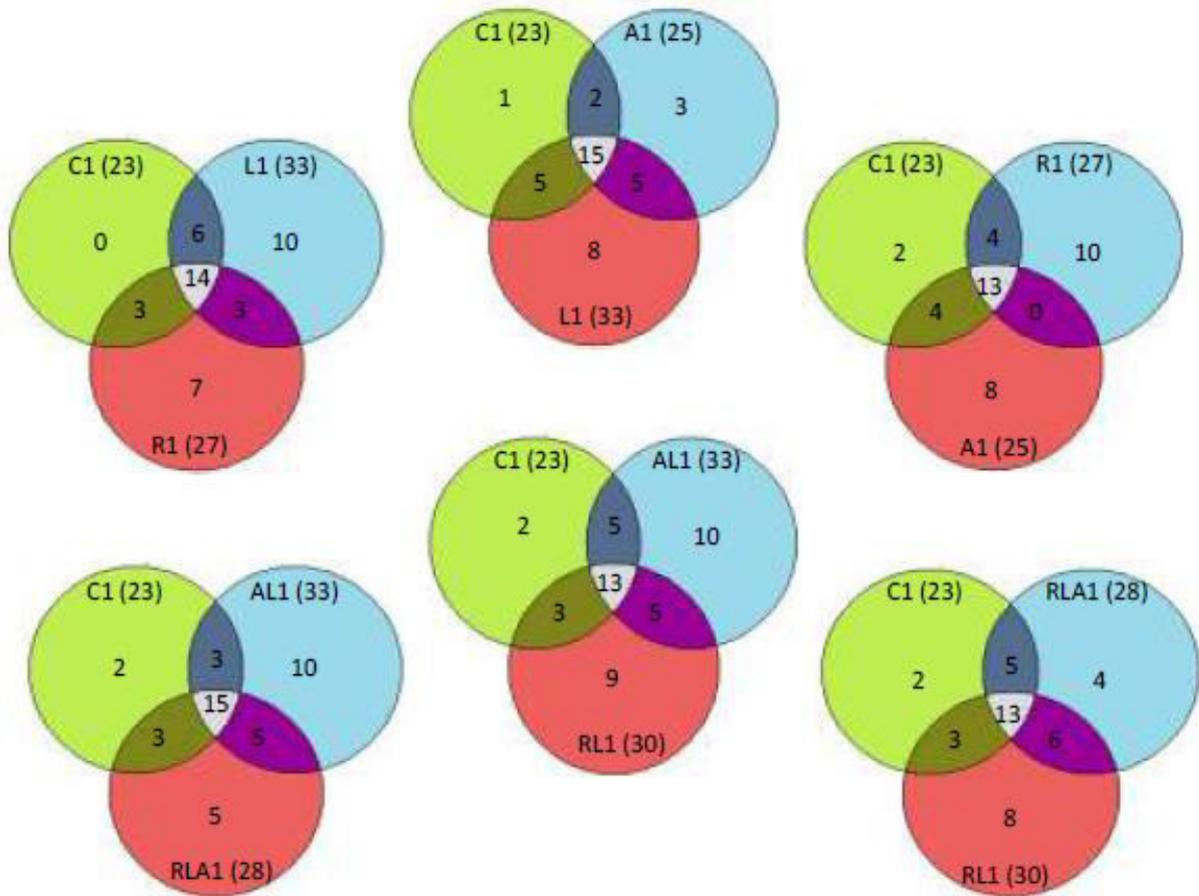
Para melhor visualização das UTOs compartilhadas entre as áreas, bem como as exclusivas de cada uma, foram gerados diagramas de Venn, com diferentes combinações entre as áreas, e, também, com a áreas C (controle).

Figura 5. UTOs exclusivas e compartilhadas entre as áreas do período seco.



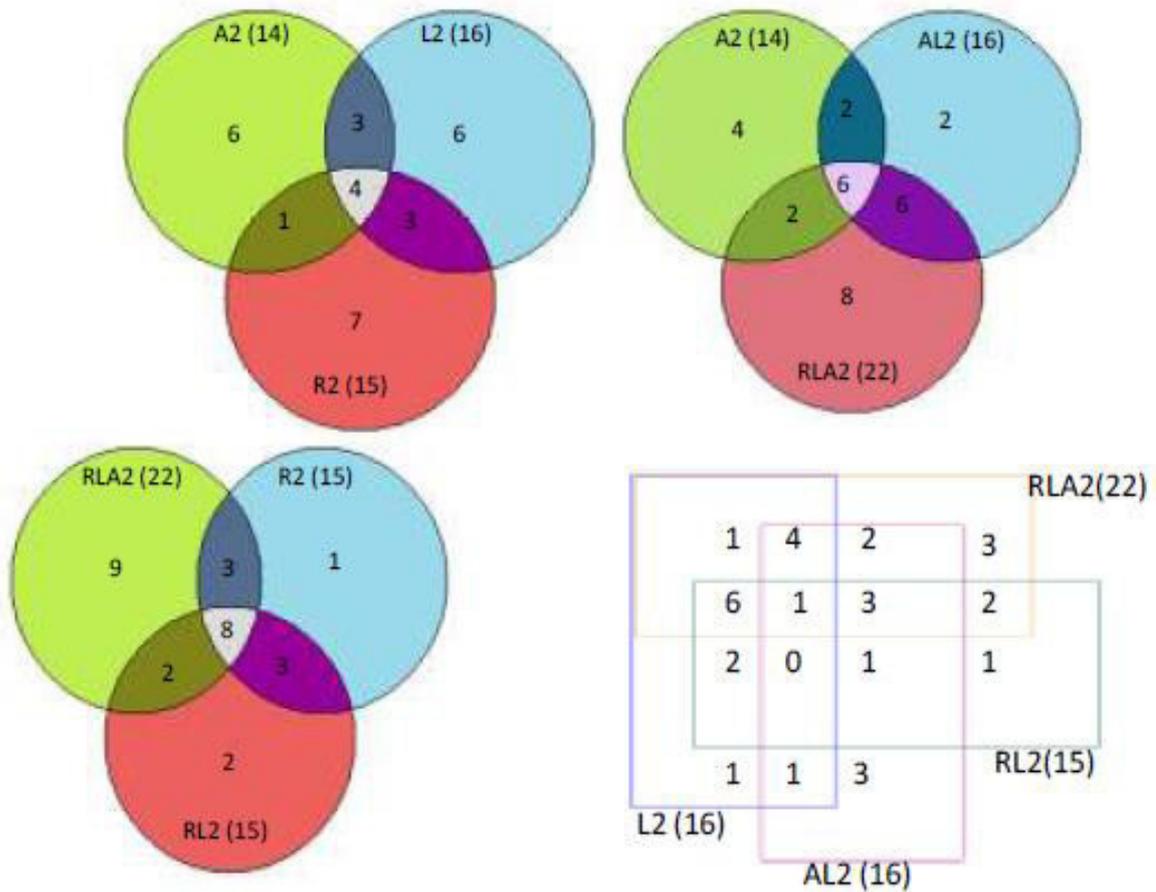
As comparações realizadas no período seco, como pode-se observar na Figura 5, mostram que as áreas que possuíam a espécie *R. mangle* em comum (R, RL e RLA), compartilharam 14 UTOs, e no geral, apresentaram poucos exclusivos. Para as outras comparações, com pontos possuindo a espécie *A. germinans* (A, RLA e AL) e *L. racemosa* (L, AL, RL e RLA), também foram encontrados poucos UTOs exclusivos, variando de 2 a 6, enquanto os compartilhados foram de 11 e 12, respectivamente. Para o conjunto contendo áreas sem mistura de espécies (R, A e L), foi encontrado um valor de UTOs exclusivos maior em R e L, e foram 11 os compartilhados entre todas as áreas, sendo o menor valor entre todos os conjuntos observados.

Figura 6. UTOs exclusivas e compartilhadas entre as áreas e o Controle no período seco.



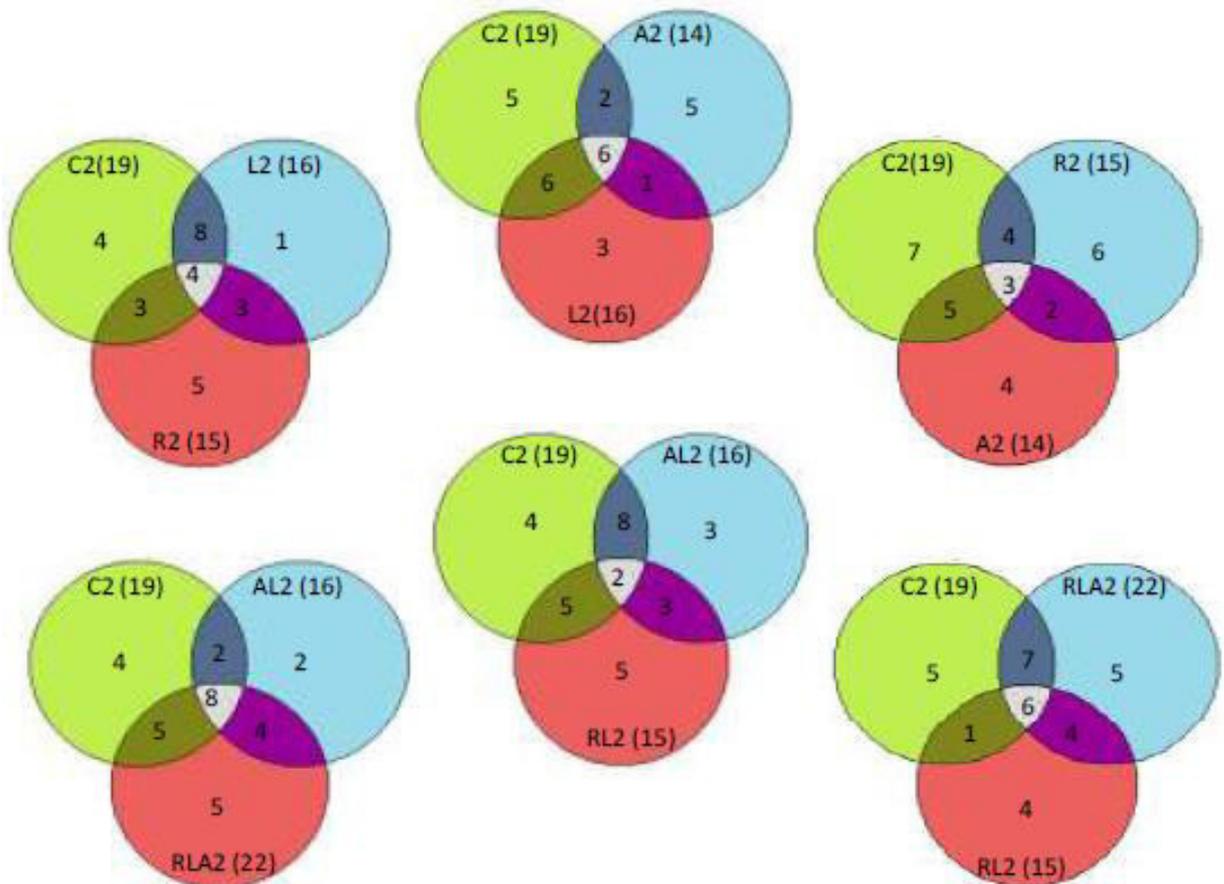
Nos conjuntos com várias combinações de áreas com o ponto controle, podemos observar uma grande quantidade de UTOs compartilhados, variando de 13 a 15. Importante observar que a área controle apresentou um valor muito baixo de UTOs exclusivos, quando comparado aos conjuntos da Figura 5. Por exemplo, juntamente com as áreas L e R, o controle não mostrou nenhuma banda exclusiva.

Figura 7. UTOs exclusivas e compartilhadas entre as áreas do período chuvoso.



Nos conjuntos comparando as áreas do período chuvoso observamos que a quantidade de UTOs compartilhados foi proporcional, em alguns, a quantidade dos exclusivos. O conjunto R, RL e RLA, foi o que apresentou maior quantidade de bandas compartilhadas, quando comparada aos outros agrupamentos, enquanto a comparação entre as áreas com *L. racemosa* em comum, teve o menor compartilhamento de UTOs.

Figura 8. UTOs exclusivas e compartilhadas entre as áreas e o Controle no período chuvoso.



As áreas controle do período chuvoso tiveram mais UTOs exclusivos, quando comparada ao período seco. O compartilhamento foi maior no conjunto do controle com as áreas A e L.

A análise de redundância (RDA) foi utilizada para relacionar os perfis obtidos pela DGGE com as variáveis ambientais, a fim de revelar quais fatores melhor explicam a estrutura das comunidades bacterianas encontradas em ambos os períodos.

A Tabela 3 mostra os valores de  $p$  para cada variável ambiental em ambas as coletas. Nenhuma das variáveis apresentou valor de  $p$  estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3. Efeitos das variáveis ambientais sobre a comunidade de Bacteria do solo das áreas amostradas, em ambos os períodos, explicados por Análise de Redundância (RDA).

		<b>pH</b>	<b>Salinidade</b>	<b>Silte+Argila</b>	<b>Matéria orgânica</b>
<b>Período seco</b>	P	0,507	0616	0,522	0,676
<b>Período chuvoso</b>	P	0,454	0,514	0,052	0,18

## 6. DISCUSSÃO

As variáveis de pH e salinidade do solo do manguezal do Rio Pacoti, quando analisadas, não mostraram grandes diferenças entre as quadras seca e chuvosa. O pH encontrado no solo com influência das diferentes espécies de mangue *R. mangle*, *L. racemosa* e *A. germinans*, assim como a mistura dessas espécies, mostrou-se de ácido a neutro. Colares e Melo (2013) obtiveram para rizosfera de *R. mangle* valores de pH de 6,41 (período chuvoso) e 7,65 (período seco). Em outros manguezais no Nordeste do Brasil, como no Rio Murici, Bahia, para o solo das mesmas espécies abordadas neste trabalho, foram obtidos valores de pH entre 6,5 e 7,7 (CUZZUOL; CAMPOS, 2001).

A salinidade elevada em todos os pontos, mais elevada que a água do mar, que é por volta de 35, exemplifica bem o cenário no qual o manguezal do Rio Pacoti encontra-se inserido. Os rios do Nordeste do Brasil são influenciados fortemente pelo clima semiárido, ou seja, sujeitos a longos períodos de estiagem, onde os períodos seco/chuvoso não são bem definidos. Taxas elevadas de evaporação, com escassez de chuvas, combinadas as mudanças que vem ocorrendo na costa do litoral brasileiro, tais como o extenso desenvolvimento turístico, aquicultura, barragem, entre outros, aumentam a erosão do solo e diminuem também o aporte de água doce, aumentando assim a salinidade dentro do ecossistema (MAIA & LIMA, 2004; LACERDA et al., 2007).

As áreas estudadas nesse trabalho, apresentaram, entre si, diferenças consideráveis no teor de matéria orgânica, no entanto, entre os períodos não foram encontradas diferenças significativas, principalmente pelo fato da pluviosidade durante o período chuvoso ter sido muito baixa, não ocasionando uma grande distinção do período seco. Os valores de M.O. que diferiram entre os pontos de coleta, possivelmente, se deve à deposição de detritos de forma distinta pelas diferentes espécies de mangue, e mistura delas, que continha em cada área. O hidrodinamismo de cada ponto também deve ser levado em consideração, pois alguns possuíam uma maior influência das marés, enquanto outros situavam-se na porção mais interior do manguezal, esse fato influencia na deposição da M.O. no sedimento. Bernini e Rezende (2010) encontraram correlação entre áreas que sofrem mais lavagens pelas marés, com menores percentuais de matéria orgânica.

A fração de silte-argila das áreas que apresentaram um alto teor de M.O., também se mostrou elevada, demonstrando a íntima relação entre essas variáveis ambientais. Segundo Vidal e Becker (2006), as partículas de pequeno tamanho estão associadas a grandes quantidades de matéria orgânica, isso porque a fração de silte-argila do solo possui uma grande capacidade de adsorção. Além disso, os valores baixos, em ambas as variáveis, apresentados pela área C, nos períodos seco e chuvoso, pode ser devido à ausência de raízes, sendo essa responsável também pela retenção de sedimentos finos.

Através da análise de componentes principais foi possível observar a diferença entre os dados abióticos e os pontos de amostragem. As variáveis de M.O. e silte-argila se agruparam em um quadrante, juntamente com as áreas que apresentaram maiores valores dessas variáveis, enquanto pH, as áreas controle, de ambos os períodos, e RLA 2, se agruparam em outro quadrante, tendo se relacionado negativamente com os demais fatores abióticos e pontos de coleta.

Para estimar a riqueza de ribotipos em cada área, durante os períodos seco e chuvoso, foi utilizada a técnica de PCR-DGGE. Essa técnica permite a visualização de bandas em um gel de gradiente desnaturante, onde o DNA proveniente da PCR é separado de acordo com sua composição nucleotídica, dessa forma, são gerados perfis distintos de comunidades, o que permite a comparação entre elas.

Vários trabalhos utilizaram-se dessa ferramenta para a obtenção de perfis de comunidades microbianas, numa escala temporal e espacial, de forma rápida e simplificada, em diversas abordagens (HASSANSHAHIAN et al, 2016; MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993; VARON-LOPEZ et al., 2014).

Zhang e colaboradores (2009), num estudo realizado em manguezais da China e um levantamento feito por Colares e Melo (2013) no mesmo manguezal do presente trabalho, obtiveram uma média de 20 e 26 bandas, respectivamente, para comunidades bacterianas do solo de florestas de mangue. Neste trabalho a média de bandas para o período seco encontra-se próximo as médias encontradas em outros trabalhos, com 28 ribotipos. No entanto, no período chuvoso essa média foi de apenas 16 bandas.

Apesar da técnica de DGGE ser uma ferramenta que permite acesso às comunidades microbianas de uma forma rápida e eficiente, alguns vieses podem ser

gerados pela sua utilização. Uma das limitações da DGGE consiste no fato de que, para uma comunidade complexa, como é o exemplo das encontradas no solo de manguezais, pode-se ter uma grande quantidade de populações em proporções relativamente equivalentes, resultando em bandas borradas e não bem definidas, o que torna difícil a identificação de populações individuais. (NAKATSU; TORSVIK; ØVREÅS, 2000).

Torsvik et al. (1990) encontrou que podem existir até 104 genomas presentes em amostras de solo. A técnica de DGGE não poderia então fazer a separação de todos esses fragmentos de 16S rDNA obtidos da imensa variedade de micro-organismos. No geral, essa técnica consegue detectar apenas as espécies predominantes dessas comunidades (MUYZER; SMALLA, 1998).

Os agrupamentos formados a partir das matrizes de presença e ausência de bandas, nos mostram quais áreas apresentaram a composição da microbiota mais semelhante umas das outras, assim como um panorama das modificações nas comunidades microbianas entre os períodos estudados nesse trabalho. No entanto, não é possível inferir que haja um padrão de modificação da época seca para a chuvosa, nesse manguezal, pois seriam necessários estudos que se estendessem por um período maior de tempo, trazendo uma perspectiva anual, não apenas sazonal das mudanças nesse manguezal.

Gomes *et al.* (2010) a fim de desvendar a relação das raízes de *R. mangle* com as comunidades bacterianas que habitavam a rizosfera dessa espécie de mangue, encontrou que de fato as raízes influenciavam na abundância e composição das comunidades microbianas. Em um trabalho mais recente, Gomes *et al.* (2014), estudaram o efeito rizosférico também para *A. germinans* e *L. racemosa*, comparadas com um sedimento sem vegetação, em um manguezal do Rio de Janeiro. Foi encontrado, então, que essas espécies também exerciam uma pressão evolutiva sobre as comunidades bacterianas, alterando a dominância de alguns grupos, abundância e riqueza.

Nos pontos de coleta desse trabalho, áreas de *A. germinans* e *R. mangle*, quando comparadas, não compartilharam nenhuma UTO. Nos agrupamentos do período chuvoso, áreas com presença de *R. mangle*, agruparam-se com uma similaridade considerável e compartilhando uma maior quantidade de UTOs iguais. O

grupo controle, de ambas as coletas, compartilhou poucos UTOs em quase todos os conjuntos analisados. Esses resultados, corroboram com a hipótese de que as raízes influenciam, de fato, na composição da microbiota do sedimento. Sabe-se que o exsudato de diferentes espécies vegetais e a disposição dos micro-organismos em diferentes zonas das raízes, influencia na estrutura das comunidades microbianas (BRIMECOMBE *et al.*, 2001).

Fatores como condições climáticas, teor de matéria orgânica, uso e manejo do local, entre muitas outras variáveis bióticas e abióticas, modulam, juntamente com as espécies vegetais, os micro-organismos da rizosfera, atuando juntos, formando essa rede complexa de interações (COSTA *et al.*, 2006; GARBEVA *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos na análise de redundância (RDA) contrastam com outros trabalhos, que mostram muitas das variáveis ambientais estudadas nesse trabalho atuando como direcionadores da estrutura e composição das comunidades microbianas. Jackson e Weeks (2008) encontraram em seus estudos que a mineralogia e a textura do solo são fatores importantes na estruturação das comunidades bacterianas. Mendes *et al.*, (2014) mostrou uma correlação significativa entre matéria orgânica e as porcentagens de silte - argila com a estrutura da comunidade em geral. Colares e Melo (2013) encontraram para comunidades de arqueia e bactérias se correlacionaram significativamente com a granulometria diferente de três habitats dentro de um manguezal. Já Fierer e Jackson (2006) obtiveram o pH como sendo a variável de maior influência na estrutura dessas comunidades, e Lozupone e Knight (2007) colocaram a salinidade como fator principal.

Tendo em vista todos os resultados obtidos, pode-se afirmar que as comunidades bacterianas foram sim influenciadas pela vegetação e que há diferença na riqueza e composição das comunidades da rizosfera de diferentes espécies de mangue e de áreas sem influência de raízes. As diferenças encontradas na riqueza de UTOs entre os períodos, mostraram que houve uma diminuição considerável no período chuvoso, onde a escassez de chuvas e diminuição do aporte de água doce, com maior influência da água do mar, pode ter influenciado fortemente nesse resultado.

No mais, pesquisas futuras que analisem os organismos que, de fato habitam o sedimento desse manguezal, trazendo respostas sobre a funcionalidade desses micro-organismos, em um período de tempo prolongado, são extremamente necessárias para se entender de que forma essa microbiota está agindo nessa área. Devido à complexidade desse ecossistema, é um desafio inferir apenas um fator que module as comunidades bacterianas, mas torna-se essencial que mais estudos sejam feitos para desvendar o que as dirige, visto que desempenham papéis fundamentais no bom funcionamento e na restauração dos manguezais.

## **7. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos apesar de mostrarem diferenças na riqueza das comunidades bacterianas, não podem determinar um fator que possa ser unicamente determinante para explicar a variação encontrada entre as áreas estudadas. Isso por que os micro-organismos dos solos estão inseridos num ambiente complexo e expostos a inúmeras variáveis que se correlacionam. Estudos de longo prazo são necessários para entender melhor os resultados encontrados, principalmente a variação da riqueza entre os períodos seco e chuvoso e a influência das diferentes espécies de mangue, e a mistura delas, na estrutura das comunidades bacterianas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAN, T.J.; GHOSH, S.; NAGESH, T.; SASMAL, D. Distribution of bacteria involved in nitrogen and sulfur cycles in shrimp culture systems of West Bengal, India. **Aquacult.**, v. 239, p. 275-288, 2004.

ALLEN, J. A.; EWEL, K.C.; JACK, J. Patterns of natural and anthropogenic disturbance of the mangroves on the Pacific Island of Kosrae, *Wetlands Ecology and Management (incorporating Mangroves and Salt Marshes)*. **Kluwer Academic Publishers**, v. 9, n. 3, p. 279-289, 2001.

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

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

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

AUBÉ, M.; CARON, L. The mangroves of the North Coast of Haiti: A preliminary assessment. *Wetl. Ecol. Manag.* v. 9, p. 271-278, 2001.

BERNINI, E.; REZENDE, C. E. Variação estrutural em florestas de mangue do estuário do rio Itabapoana, ES-RJ. **Biotemas**, v.23(1), p. 49-60, 2010.

BHARATHI, P.A.L.; OAK, S.; CHANDRAMOHAN, D. Sulfate reducing bacteria from mangrove swamps. 2. Their ecology and physiology. **Oceanol. Acta**, v.14, p. 163-171, 1991.

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

BUNT, J.S., Mangrove Zonation: An Examination of Data from Seventeen Riverine Estuaries in Tropical Australia. **Ann. of Bot.**, v. 78, p. 333-341, 1996.

CANTERA, J.R., ARNAUD, P.M. Structure et distribution des associations de mangrove de deux baies de la côte pacifique de Colombie. In Kjerfve, B. et al. (eds), **Mangrove Ecosystem Studies in Latin America and Africa**. UNESCO, Paris, p. 71–97, 1997.

CINTRÓN, G.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Ecology and management New World mangroves. **Coastal plant communities of Latin America**, p. 233-258, 1992.

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

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

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

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

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

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

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

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

GIRI, C. *et al.* Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**, v. 20, n. 1, p. 154–159, 2011.

GOMES, N. C. M. *et al.* Assessing variation in bacterial composition between the rhizospheres of two mangrove tree species. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 139, p. 40-45, 2014.

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

GORAYEB, A.; SILVA, E.V.; MEIRELES, A.J.A. Impactos ambientais e propostas de manejo sustentável para a planície flúvio-marinha do Rio Pacoti-Fortaleza/Ceará. **Revista Sociedade e Natureza**, Uberlândia, v.17, n.33, p.143-152, 2005.

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

HASSANSHAHIAN, M. *et al.* Comparison the effects of bioaugmentation versus biostimulation on marine microbial community by PCR-DGGE: A mesocosm scale. **Journal of environmental Sciences**, v.43, p. 136-146, 2016.

HOGARTH, P.J., **The Biology of Mangroves and Seagrasses Second edition**, New York (Oxford University Press), 2010.

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

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

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

KOMIYAMA, A., EONGONG, J.; POUNGPARN, S. Allometry biomass and productivity of mangrove forests: A review. **Aqua. Bot.**, v. 89, p. 128 - 137, 2007.

KRAUSE, G., BOCK, M., WEIERS, S.; BRAUN, G. Mapping Land-Cover and Mangrove Structures with Remote Sensing Techniques: A Contribution to a Synoptic GIS in Support of Coastal Management in North Brazil. **Env. Manag.**, v. 34(3), p. 429 – 440, 2004.

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

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

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

MALIK, S.; BEER, M.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International*, v. 34, n. 2, p. 265–76, 2008.

MCKEE, K. L. Seedling recruitment patterns in a Belizean mangrove forest: Effects of establishment ability and physico-chemical factors. *Oecologia* v. 101(4), p. 448-460, 1995.

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

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

MUYZER, G.; RAMSING, N, B. Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Wat. Sci. Tech.*, v.32, p. 1-9, 1995.

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

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

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

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

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

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

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

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezal, marisma e apicum (Diagnóstico Preliminar). **In: Avaliações e ações prioritárias para conservação da biodiversidade das Zonas Costeira e Marinha**. p. 226, 2002.

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

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

SPIEGELMAN, D.; WHISSEL, G.; GREER, C. W. A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 355-386, 2005.

STALEY, J. T.; KONOPKA, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.39 p. 321–346, 1985.

TAM, N. E. Y.; YUK-SHAN, W., LU, C. Y.; BERRY, R. Mapping and characterization of mangrove plant communities in Hong Kong. **Hydrobiologia**, v. 352(1-3), p. 25-37, 1997.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAL, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.56, p. 782–787, 1990

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

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

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

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

VIDAL, R. M. B.; BECKER, H. Distribuição de Manganês, Ferro, Materia Orgânica e Fosfato nos Sedimentos do Manguezal do Rio Piranji, Ceará. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza – CE, v. 39, 34-43 p. 2006.

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

YUVARAJ, E.; DHARANIRAJAN, K.; JAYAKUMAR, S.; BALASUBRAMANIAM, J. Distribution and zonation pattern of mangrove forest in Shoal Bay Creek, Andaman Islands, India. **Indian Journal of Geo Marine Sciences**, v. 46, p. 597-604, 2017.

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