



**Patrícia Tavares
Martins**

**Decomposição *in situ* de *Phragmites australis*:
comunidades bacterianas**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2009

**Patrícia Tavares
Martins**

**Decomposição *in situ* de *Phragmites australis*:
comunidades bacterianas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Marinha, realizada sob a orientação científica do Doutor Victor Quintino, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação da Doutora Ana Maria Rodrigues, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

Presidente

Profa. Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Vogais

Prof. Doutor Victor Quintino (orientador)
professor auxiliar da Universidade de Aveiro

Profa. Doutora Ana Maria Rodrigues (co-orientadora)
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutor Newton Gomes
investigador auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Doutor Victor e à Doutora Ana, pela oportunidade que me deram para desenvolver um trabalho numa área diferente da que inicialmente estava prevista, e pela disponibilidade para me orientarem durante todo o trabalho.

Às pessoas do Laboratório de Estudos Moleculares em Ambientes Marinhos, por toda ajuda disponibilizada durante o trabalho prático relativo à parte de biologia molecular.

À Marta, que me acompanhou desde o meu primeiro dia de mestrado. Durante a preparação das saídas de campo, nas cansativas saídas à Ria, na parte da biologia molecular e na elaboração deste relatório.

À Ana Luisa, pela disponibilidade, paciência e toda a ajuda que me deu na parte da biologia molecular e também na elaboração deste relatório. Teve sempre disponível para me ajudar apesar de andar sempre ocupada.

Ao Fernando, pela imensa ajuda durante as saídas de campo, e pela imediata disponibilidade sempre que pedi ajuda.

À Adília, que teve que levar comigo a mexer no equipamentos que até eu chegar eram só dela.

Ao Leandro, pela ajuda na parte estatística.

Ao Sr. Rui, ao Darlan e ao Renato também pela ajuda prestada nas saídas de campo.

Aos meus amigos, a quem algumas vezes tive que dizer não porque tinha que trabalhar.

À minha família que me apoiou incondicionalmente durante este ano e meio de trabalho, e compreendeu que às vezes o cansaço não me permitia estar mais presente.

Muito obrigada a todos!

palavras-chave

Decomposição, *Phragmites australis*, gradiente de salinidade, Ria de Aveiro, comunidade bacteriana, DGGE

resumo

A utilização de sacos de folhas submersos em estudos de decomposição é um método frequentemente utilizado para estudar ecossistemas de água doce. Usualmente recorre-se ao cálculo da taxa de decomposição das folhas, ao padrão temporal das comunidades de macroinvertebrados e à colonização das comunidades microbianas, uma vez que durante a degradação das folhas ocorre uma sucessão de organismos, que reflecte um ajustamento das comunidades biológicas do ambiente envolvente.

Neste trabalho pretende-se estudar as comunidades bacterianas que colonizam as folhas de *Phragmites australis* colocadas em sacos submersos num estuário e recolhidas após 3, 7, 15, 30 e 60 dias de submersão. O trabalho decorreu no canal de Mira, na Ria de Aveiro, onde foram definidas 3 áreas de amostragem (A, C e E).

As comunidades bacterianas foram analisadas recorrendo a métodos moleculares, nomeadamente através da electroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).

Neste trabalho foi possível observar que as comunidades bacterianas colonizadoras das folhas são distintas em cada dia em todas as estações de amostragem, com excepção do 15º dia. Junto à embocadura do estuário (zona A) as comunidades bacterianas são idênticas apenas no 3º e 7º dia, apresentando diferenças significativas entre os restantes tempos de amostragem. Na região mediana do estuário (zona C) verifica-se que a comunidade bacteriana no 15º, 30º e 60º dias de amostragem não apresentam diferenças significativas, ao contrário do dia 3 e 7. No topo da região estuarina, em ambiente dulçaquícola (zona E), não foi possível analisar o 60º dia de amostragem, porém observa-se uma separação entre os dois primeiros dias de amostragem (3º e 7º) e os dois últimos (15º e 30º) nas comunidades bacterianas.

Pela análise do número de ribotipos, verificou-se que apenas no 3º dia existem diferenças significativas entre as três zonas de amostragem e, no 60º dia a zona C e E também são significativamente diferentes. Nos restantes dias o número de ribotipos é semelhante em todas as zonas. Foi ainda possível verificar que para a zona A e a zona E, não existem diferenças significativas no número de ribotipos ao longo do tempo, ao contrário do que acontece na zona C, onde ocorre um aumento gradual do número de ribotipos ao longo do tempo.

keywords

Leaf decomposition, *Phragmites australis*, salinity gradient, Ria de Aveiro, bacterial community, DGGE.

abstract

The use of leaf-bags to study leaf litter decomposition is a method often used in freshwater ecosystems. Usually these studies use the rate of leaf decomposition, the temporal pattern of macroinvertebrate communities and colonization of microbial communities, because during the leaves breakdown a succession of organisms occurs, which reflects an adjustment of the biological communities in the surrounding environment.

The aim of this work was to study the bacterial communities that colonize *Phragmites australis* leaves in the litter bags, in an estuary, after 3, 7, 15, 30 and 60 days of submersion. The work took place in Mira channel, in Ria de Aveiro, where 3 sampling sites were established along a salinity gradient. Bacterial communities were analyzed using molecular methods, namely by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).

In this study it was observed that the bacterial communities that colonize the leaves submerged in Ria de Aveiro are different at all sampling sites on each day, except the 15th. At the mouth of the estuary (site A), the bacterial communities are identical in the 3rd and 7th day, showing significant differences between the remaining sampling times.

In the middle estuary (site C) the bacterial community in the 15th, 30th and 60th day did not differ significantly, unlike at days 3 and 7. At the head of estuary, in freshwater (site E), it was not possible to analyze the day 60, but there was a separation in the bacterial communities between the first two days of sampling (3 and 7) and the last two (15 and 30).

The analysis of the number of ribotypes, showed that there are significant differences between the three sampling areas only in the 3rd day. In day 60 sites C and E are significantly different. In the remaining days the number of ribotypes is similar in all sites. It was also possible to see that for sites A and E, there are no significant differences in the number of ribotypes over time, contrary to what happened in site C, where there was a gradual increase in the number of ribotypes over time.

Índice

Lista de Figuras	ii
Lista de Tabelas	iii
1. Introdução	1
1.1 Importância da decomposição da matéria orgânica em ecossistemas aquáticos	3
1.2 Decomposição de folhas submersas e sua colonização	3
1.3 <i>Phragmites australis</i>	5
1.4 As Comunidades Bacterianas	6
1.5 Vantagens da utilização dos métodos moleculares na análise da comunidade bacteriana	7
1.5.1 Polimerase Chain Reaction (PCR)	10
1.5.2 Electroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)	12
1.6 Estudos sobre a diversidade das comunidades bacterianas na decomposição foliar	15
1.7 A Ria de Aveiro	16
2. Objectivos	18
3. Metodologia	18
3.1 Área de Estudo	18
3.2 Colheita e preparação das folhas de <i>Phragmites australis</i>	19
3.3 Colocação e recolha dos sacos com <i>Phragmites australis</i> no canal de Mira	20
3.4 Processamento laboratorial das amostras	21
3.4.1 Extracção de DNA e PCR	22
3.4.2 DGGE	24
3.4.2.1 Preparação das soluções	24
3.4.2.2 Polimerização do gel	24
3.4.2.3 Corrida do gel	24
3.4.2.4 Coloração do gel	25
3.4.2.5 Digitalização do gel	26
3.5 Análise Estatística	27
4. Resultados	28
4.1 Análise da comunidade bacteriana das três áreas (A, C e E) para cada momento de amostragem	28
4.1.1 Análise da abundância relativa dos ribotipos	28
4.1.2 Análise da riqueza em ribotipos	33
4.2 Análise da comunidade bacteriana de cada área de amostragem ao longo do tempo	35
4.2.1 Análise da abundância relativa dos ribotipos	35

4.2.2	Análise da riqueza em ribotipos	38
5.	Discussão	40
6.	Sugestões para estudos futuros	43
7.	Bibliografia	45

Lista de Figuras

FIGURA 1	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENE DE rDNA.	9
FIGURA 2	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS PRINCIPAIS ETAPAS QUE OCORREM DURANTE O PCR.	11
FIGURA 3	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AMPLIFICAÇÃO QUE OCORRE EM CADA CICLO DURANTE O PCR	11
FIGURA 4	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE: A) DESNATURAÇÃO DA AMOSTRA AO LONGO DO GEL B) PADRÃO DE BANDAS NO GEL	14
FIGURA 5	- LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA RIA DE AVEIRO .	17
FIGURA 6	- DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS DE AMOSTRAGEM PARA CADA ÁREA AO LONGO DO CANAL DE MIRA.	19
FIGURA 7	- FIGURA REPRESENTATIVA DE UMA PRENSA DE SECAGEM	20
FIGURA 8	- PESAGEM DAS FOLHAS DE <i>PHRAGMITES AUSTRALIS</i> .	20
FIGURA 9	- SACO DE NYLON DE MALHA 5MM COM AS FOLHAS DE <i>PHRAGMITES AUSTRALIS</i> .	20
FIGURA 10	- DISPOSIÇÃO DOS SACOS DE <i>PHRAGMITES AUSTRALIS</i> APÓS SUBMERSAS EM CADA PONTO DE AMOSTRAGEM. .	21
FIGURA 11	- SACOS DE <i>PHRAGMITES AUSTRALIS</i> SUBMERSAS NA RIA.	21
FIGURA 12	- MJ MINI THERMAL-CYCLER (CITOMED).	22
FIGURA 13	- GEL REFERENTE À DISTRIBUIÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS NAS TRÊS ÁREAS DE AMOSTRAGEM PARA O 3º DIA. AS SETAS INDICAM RIBOTIPOS QUE PARECEM IMPORTANTES NA COMUNIDADE.	28
FIGURA 14	- ANÁLISE DE ORDENAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA NAS TRÊS ÁREAS DE AMOSTRAGEM NO 3º DIA DE RECOLHA.	29
FIGURA 15	- ANÁLISE DE ORDENAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NAS TRÊS ÁREAS DE AMOSTRAGEM (A, C E E) NO 7º DIA.	30
FIGURA 16	- ANÁLISE DE ORDENAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NAS TRÊS ÁREAS DE AMOSTRAGENS (A, C E E) NO 15º DIA DE RECOLHA.	30
FIGURA 17	- ANÁLISE DE ORDENAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NAS TRÊS ÁREAS DE AMOSTRAGEM (A, C E E) RELATIVAMENTE AO 30º DIA DE RECOLHA.	31
FIGURA 18	- GEL REFERENTE À DISTRIBUIÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS NAS TRÊS ÁREAS DE AMOSTRAGEM PARA O 30º DIA.	31
FIGURA 19	- GEL REFERENTE ÀS COMUNIDADES BACTERIANAS PRESENTES NAS AMOSTRAS DAS TRÊS ÁREAS DE AMOSTRAGEM PARA O 60º DIA. AS SETAS INDICAM RIBOTIPOS QUE PARECEM IMPORTANTES NA COMUNIDADE.	32
FIGURA 20	- ANÁLISE DE ORDENAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NAS TRÊS ÁREAS DE AMOSTRAGEM (A, C E E) NO 60º DIA DE RECOLHA.	33

FIGURA 21 - GEL REFERENTE À DISTRIBUIÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS DA ÁREA A AO LONGO DOS TEMPOS DE AMOSTRAGEM. AS SETAS INDICAM RIBOTIPOS QUE PARECEM IMPORTANTES NA COMUNIDADE.	35
FIGURA 22 - ANÁLISE DE ORDENAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA NA ÁREA DE AMOSTRAGEM A AO LONGO DOS 5 TEMPOS DE AMOSTRAGEM (3 ^o , 7 ^o , 15 ^o , 30 ^o E 60 ^o DIA).	36
FIGURA 23 - DISTRIBUIÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS AO LONGO DOS TEMPOS DE AMOSTRAGEM PARA A ÁREA C. AS SETAS INDICAM RIBOTIPOS QUE PARECEM IMPORTANTES NA COMUNIDADE.	37
FIGURA 24 - ANÁLISE DE ORDENAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA NA ÁREA DE AMOSTRAGEM C AO LONGO DO TEMPO.	37
FIGURA 25 - ANÁLISE DE ORDENAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA NA ÁREA DE AMOSTRAGEM E AO LONGO DO TEMPO (À EXCEÇÃO DO DIA 60).	38

Lista de Tabelas

TABELA 1 - VOLUMES DE REAGENTES NECESSÁRIOS PARA UMA REACÇÃO DE PCR COM UM VOLUME FINAL DE 25 µL:	23
A) PARA O PRIMEIRO PCR B) PARA O SEGUNDO PCR	23
TABELA 2 - VALORES UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DE UM GEL COM UM GRADIENTE DE DESNATURAÇÃO DE 32% E 69%. ...	24
TABELA 3 - PERMANOVA VALORES DE F DOS TESTES GLOBAIS (COM VALORES DE SIGNIFICÂNCIA ASSOCIADO ENTRE PARÊNTESES) E VALORES DE T DA COMPARAÇÃO À POSTERIORI DUAS A DUAS (COM VALORES DE SIGNIFICÂNCIA ASSOCIADO ENTRE PARÊNTESES) PARA VALORES DE ABUNDÂNCIA RELATIVA DE RIBOTIPOS ENTRE AS ÁREAS PARA CADA MOMENTO DE AMOSTRAGEM.....	29
TABELA 4 - PERMANOVA VALORES DE F DOS TESTES GLOBAIS (COM VALORES DE SIGNIFICÂNCIA ASSOCIADO ENTRE PARÊNTESES) E VALORES DE T DA COMPARAÇÃO À POSTERIORI DUAS A DUAS (COM VALORES DE SIGNIFICÂNCIA ASSOCIADO ENTRE PARÊNTESES) PARA VALORES DE RIQUEZA EM RIBOTIPOS ENTRE AS ÁREAS PARA CADA MOMENTO DE AMOSTRAGEM. .	33
TABELA 5 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO ASSOCIADO DO NÚMERO DE RIBOTIPOS DE CADA ÁREA PARA CADA MOMENTO DE AMOSTRAGEM.....	34
TABELA 6 - PERMANOVA VALORES DE F DOS TESTES GLOBAIS (COM VALORES DE SIGNIFICÂNCIA ASSOCIADO ENTRE PARÊNTESES) E VALORES DE T DA COMPARAÇÃO À POSTERIORI DUAS A DUAS (COM VALORES DE SIGNIFICÂNCIA ASSOCIADO ENTRE PARÊNTESES)) PARA VALORES DE ABUNDÂNCIA RELATIVA DE RIBOTIPOS ENTRE OS MOMENTOS DE AMOSTRAGEM PARA CADA ÁREA..	36
TABELA 7 - PERMANOVA VALORES DE F DOS TESTES GLOBAIS (COM VALORES DE SIGNIFICÂNCIA ASSOCIADO ENTRE PARÊNTESES) E VALORES DE T DA COMPARAÇÃO À POSTERIORI DUAS A DUAS (COM VALORES DE SIGNIFICÂNCIA ASSOCIADO ENTRE PARÊNTESES) PARA OS VALORES DE RIQUEZA DE RIBOTIPOS ENTRE OS MOMENTOS DE AMOSTRAGEM PARA CADA ÁREA.	399

TABELA 8 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO ASSOCIADO DO NÚMERO DE RIBOTIPOS DE CADA ÁREA PARA OS 5 MOMENTOS DE AMOSTRAGEM..... 40

1. Introdução

A elevada densidade humana nas áreas costeiras associadas a aglomerações urbanas e industriais e à agricultura intensiva provoca grande pressão sobre as massas de água superficiais e conseqüente diminuição da qualidade ecológica (Castela *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, os ecossistemas aquáticos têm sido alterados de maneira significativa em função de múltiplos impactos ambientais provenientes principalmente de actividades antropogénicas como a construção de barragens e represas, o lançamento de efluentes domésticos e industriais não tratados, a exploração exagerada do recursos pesqueiros, entre outros. O resultado destas actividades reflecte-se na diminuição da qualidade ecológica e conseqüente perda de biodiversidade aquática e alteração da dinâmica natural das comunidades biológicas (Goulart e Callisto, 2003).

Avaliação da qualidade da água, até muito recentemente baseava-se sobretudo em parâmetros físico-químicos, deixando para segundo plano os processos biológicos que estudam a qualidade da água através da relação entre os organismos aquáticos e o meio, e as relações estabelecidas entre esses próprios organismos (Alba-Tercedor, 1996).

Com a monitorização de variáveis físicas e químicas é possível uma identificação imediata de alterações nas propriedades físicas e químicas da água, com detecção precisa da variável modificada e determinação das concentrações alteradas (Alba-Tercedor, 1996). Contudo, este tipo de monitorização é pouco eficiente, pois fornece somente uma fotografia momentânea do que pode ser uma situação muito dinâmica, não detectando nomeadamente alterações na diversidade de habitats e microhabitats nem as conseqüências das alterações da qualidade da água sobre as comunidades biológicas (Goulart e Callisto, 2003)

A Directiva Quadro da Água, da União Europeia, altera por princípio este panorama, pois a monitorização do estado de qualidade da água deixa de se restringir aos seus usos, para se concentrar sobre o estado ecológico.

Os métodos biológicos impõem-se pela capacidade de detecção da acção de poluentes quando presentes em baixas concentrações e/ou quando em descargas descontínuas e de situações pontuais de poluição tóxica, nem sempre possível através de métodos puramente físico-químicos (Peixoto, 2008). Para além disso, as comunidades biológicas reflectem a integridade ecológica total dos ecossistemas (ex. integridade física, química e biológica), englobando os efeitos dos diferentes agentes impactantes e fornecendo uma medida agregada dos impactos (Goulart e Callisto, 2003).

A decomposição de folhas submersas em sistemas aquáticos tem mostrado potencial para ser usada como ferramenta para avaliar o funcionamento de ecossistemas de água doce (Webster *et al.*, 2001), uma vez que a matéria orgânica proveniente das folhas tem grande importância nestes sistemas. Associado ao estudo das taxas de decomposição das folhas, é possível também estudar-se o padrão temporal das comunidades de macroinvertebrados e a colonização das comunidades microbianas, uma vez que durante a degradação das folhas ocorre uma sucessão de organismos, que reflecte um ajustamento das comunidades biológicas ao ambiente envolvente (Braioni *et al.*, 2001).

Nas folhas em decomposição, a comunidade microbiana decompositora “digere” os polímeros estruturais (lignocelulose) das plantas vasculares convertendo os detritos em biomassa microbiana e nutrientes dissolvidos, de fácil digestão para a maioria dos metazoários consumidores. Em seguida há um rápido crescimento das bactérias heterotróficas, devido à presença de matéria orgânica particulada, e posteriormente vai ser assimilada por macroinvertebrados. Assim, as bactérias funcionam como um elo fundamental entre os detritos de plantas vasculares e os níveis tróficos superiores (Anesio *et al.*, 2003), pelo que é importante o estudo destas comunidades.

Até muito recentemente, o papel das comunidades microbianas decompositoras baseava-se no cálculo da biomassa bacteriana e fúngica e na sua produtividade (Duarte *et al.*, 2009). Porém, com a introdução de técnicas moleculares de *fingerprint*, como o DGGE, actualmente já é possível estudar a diversidade das comunidades microbianas (Das *et al.*, 2007).

1.1 Importância da decomposição da matéria orgânica em ecossistemas aquáticos

A dinâmica de matéria orgânica em ecossistemas lóticos tem despertado grande interesse desde o estudo pioneiro realizado por Fisher & Likens (1973).

Vários estudos sugerem que em sistemas marinhos de baixa profundidade e em ecossistemas de água doce, a matéria orgânica proveniente de fontes alóctones (vegetação ripícula) excede substancialmente a energia convertida através da fotossíntese (Anesio *et al.*, 2003; Moretti, 2005). O que acontece neste sistemas aquáticos, é que a vegetação ripícula é demasiado densa e deste modo impede a entrada de luminosidade necessária para que haja uma eficiente produção primária, suficiente para manter em funcionamento o metabolismo destes ecossistemas (Gonçalves *et al.*, 2006). Já nos grandes rios, a vegetação ripícula não tem muita importância, uma vez que existe uma grande área de penetração de luz que estimula a produção primária autóctone e assim ocorre uma diminuição na quantidade de matéria orgânica alóctone importada, por unidade de superfície (Menéndez *et al.*, 2001).

Portanto, nos sistemas aquáticos onde a vegetação ripícula é densa, a maioria da energia provém de fontes alóctones, o que torna a vegetação ripícula e, nomeadamente os processos de decomposição desta, um componente muito importante na produção biológica destes sistemas (Fleituch e Leichtfried, 2004).

1.2 Decomposição de folhas submersas e sua colonização

Tem sido proposto que as taxas de decomposição de folhas podem ser utilizadas como ferramentas para avaliar a qualidade ambiental (Sangiorgio *et al.*).

A utilização de sacos de folhas submersos em sistemas aquáticos é um dos métodos mais comum para avaliar não só a taxa de decomposição, mas também o padrão temporal das comunidades de macroinvertebrados ou da colonização

microbiana (Braioni *et al.*, 2001), uma vez que durante a degradação das folhas ocorre uma sucessão de organismos que reflecte um ajustamento das comunidades biológicas ao ambiente envolvente (Sampaio *et al.*, 2004).

A decomposição pode ser definida como a degradação gradual da matéria orgânica morta provocada por factores físicos, químicos e biológicos, e do qual resulta gás carbónico, água e nutrientes inorgânicos (Moretti, 2005).

A velocidade de decomposição dos materiais orgânicos submersos pode variar, dependendo de factores abióticos e bióticos, como a temperatura da água e velocidade da corrente, composição da comunidade decompositora, qualidade do ambiente, tipo de substrato, disponibilidade de oxigénio, de entre outros factores (Abelho, 2008).

A decomposição pode ser dividida em três etapas principais, lixiviação, condicionamento microbiano e fragmentação por actividade mecânica (Gessner *et al.*, 1999).

A primeira etapa ocorre nas primeiras 24 horas, e é caracterizada pela rápida perda inicial de compostos solúveis como fenóis, carboidratos e aminoácidos devido à lixiviação (perda de peso do substrato) (Canhoto e Graça, 1996).

A segunda etapa é marcada pela colonização e degradação microbiana, responsável por modificações químicas e físicas nos substratos, designado também por “condicionamento” (Graça, 2001).

Os primeiros microorganismos a colonizar as folhas são bactérias e fungos (Suberkropp, 2001). Estes microorganismos são dos poucos que conseguem secretar enzimas (celulases, xilases e pectinases) capazes de transformar macromoléculas como a celulose, a quitina e a lenhina em compostos mais pequenos, que podem ser assimilados pelo restante biota (Das, 2007).

Estudos têm demonstrado que a biomassa fúngica é superior à biomassa bacteriana nos primeiros estádios de decomposição, e que o seu crescimento é acompanhado por um aumento de nitrogénio na superfície da folha, o que sugere que são os fungos os primeiros decompositores (Duarte, 2008). Contudo, as bactérias conseguem utilizar compostos orgânicos, nomeadamente matéria

orgânica particulada e matéria orgânica dissolvida, que é libertada durante a decomposição das folhas devido às actividades dos fungos e macroinvertebrados, e à lise das células dos fungos mortos (Duarte, 2008). Nesta fase a perda de peso ocorre em menor velocidade do que na lixiviação (Webster e Benfield, 1986).

Existem bastantes evidências que sugerem que o “condicionamento” é um processo extremamente importante para os primeiros invertebrados colonizadores. Têm-se demonstrado que os primeiros invertebrados colonizadores têm preferência em alimentar-se em folhas que sofreram “condicionamento” e que a sua abundância está fortemente correlacionada com a biomassa fúngica existente nas folhas (Graça, 2001). Uma possível explicação para este facto é que os invertebrados beneficiam da acção dos fungos sobre as folhas e/ou que os invertebrados se alimentam dos fungos.

A terceira fase é caracterizada pela colonização de invertebrados, que origina fragmentação mecânica do substrato, acelerando significativamente a decomposição (Petersen e Cummins, 1974).

Apesar desta distinção em fases, estudos têm sugerido que estas fases não são temporalmente distintas e que, na realidade são independentes e se sobrepõem ao longo do processo (Gessner *et al.*, 1999).

1.3 *Phragmites australis*

Em ecossistemas de zonas húmidas uma parte considerável da produção de material orgânico é formada por macrófitas (Komínková *et al.*, 2000), que desempenham um papel importante na cadeia alimentar detritívora (Sangiorgio *et al.*, 2007).

Phragmites australis, nome comum caniço, é a mais comum das macrófitas do mundo em zonas húmidas. É uma das espécies de água doce mais difundida, muitas vezes formando densos povoamentos (Gessner, 2001) que constituem um dos mais produtivos tipos de ecossistemas em regiões temperadas (Sabetta *et al.*, 2000).

Pouca parte deste material é consumida como tecido vivo (Polunin, 1984; Ostendorp, 1993), uma vez que a maior parte da sua biomassa entra em circulação sobre forma de matéria orgânica particulada após a sua senescência e morte. Assim, a decomposição desta planta torna-se um importante processo em ambientes dulçaquícolas incluindo zonas litorais de lagos (Gessner, 2000).

A decomposição de *Phragmites australis* tem recebido considerável atenção em estudos de decomposição em ecossistemas aquáticos de água doce. Estudos anteriores sobre a dinâmica de *P. australis* têm-se centrado na sua decomposição, em taxas de perda de massa (Polunin, 1982; Hietz, 1992; Wrubleski et al., 1997; Gessner, 2001; Dinka et al., 2004), e na dinâmica de bactérias e fungos associados (Ágoston-Szabó et al., 2006).

Sangiorgio et al. (2007) e Quintino et al. (2009) desenvolveram estudos relativos à taxa de decomposição de *Phragmites australis* em sistemas de transição. No caso particular do estudo efectuado por, Quintino et al. (2009), a taxa de decomposição de *Phragmites australis* foi estudada ao longo de um gradiente completo de salinidade.

1.4 As Comunidades Bacterianas

As bactérias colonizam os mais variados tipos de ambientes terrestres e aquáticos, ocorrendo em locais aparentemente inóspitos como aqueles sem oxigénio ou com elevadas temperaturas (fontes termais). Encontram-se entre os seres vivos mais antigos, colonizando o planeta Terra há mais de 2 bilhões de anos. Até recentemente estavam descritas 3000-4000 espécies de bactérias, contudo estima-se que o número de espécies bacterianas em todo o mundo se encontra perto dos 3 milhões (Das et al., 2006).

Nos ambientes aquáticos, encontram-se entre os menores organismos, sendo que as formas planctónicas medem, em geral, entre 0,2 e 0,5 μm , mas podendo atingir até 100 μm quando se desenvolvem em superfícies ou em sedimentos (Stolp, 1988). Comparativamente a outros organismos, o tempo de duplicação das bactérias é relativamente curto, da ordem de 15 a 20 minutos,

embora esse tempo seja geralmente superior a 2 horas na maioria dos ambientes aquáticos (Thomaz, 1999).

A comunidade bacteriana, juntamente com os fungos, tem sido encarada, desde os primórdios da ecologia, como decompositora da matéria orgânica, assumindo um papel central no retorno dos nutrientes para os ecossistemas aquáticos e terrestres (Mille-Lindblom e Tranvik, 2003; Duarte *et al.*, 2009).

Em grande parte, as teorias modernas acerca do papel das bactérias estão baseadas no mecanismo de consumo da matéria orgânica dissolvida ou carbono orgânico dissolvido (COD) por esses microrganismos, que transformam essa fracção de carbono dissolvida em matéria orgânica particulada (Thomaz, 1999).

1.5 Vantagens da utilização dos métodos moleculares na análise da comunidade bacteriana

Devido à importância das bactérias na reciclagem de nutrientes e matéria orgânica nos ecossistemas, a identificação dos microrganismos presentes numa comunidade é fundamental para perceber o seu funcionamento.

Até muito recentemente, a taxonomia microbiana era feita através do isolamento de culturas puras (cultivo de microrganismos em laboratório) e seguida por testes fisiológicos e bioquímicos (ex: coloração de Gram, degradação da glicose, etc) (Amann *et al.*, 1995). Apesar da sua contribuição para o conhecimento da diversidade das comunidades naturais, os organismos cultiváveis constituem apenas uma pequena fracção da diversidade de espécies em comunidades microbianas (Tagliaferro, 2005). Na verdade menos de 1% das bactérias existentes na natureza podem ser cultivadas em laboratório (Torsvik *et al.*, 1990). Para além disso, a selectividade dos meios de cultura tem implicações graves para o estudo da composição das comunidades microbianas naturais, e os resultados obtidos usando isolados de culturas puras nem sempre são reprodutíveis devido à variabilidade nas propriedades fenotípicas das bactérias

em função das condições de cultura (Amann *et al.*, 1995; Boivin-Jahns *et al.*, 1995).

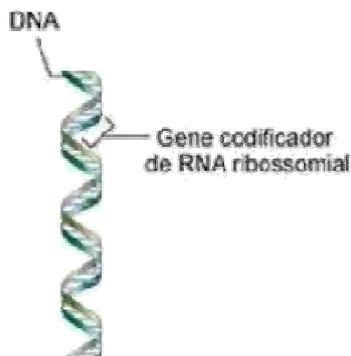
As propriedades dos microrganismos *ex situ* podem também ser diferentes, pela ausência de interacção entre populações ou com o ambiente natural, ou devido ao facto destas alterarem o seu estado fisiológico como medida de adaptação ao ambiente modificado (meios de cultura) (Boivin-Jahns *et al.*, 1995).

Contudo e apesar destas limitações, os métodos microbiológicos tradicionais (análise de géneros cultiváveis em laboratório e contagem ao microscópio do número de diferentes morfotipos após coloração com corantes fluorescente) foram os mais aplicados relativamente ao estudo da diversidade de bactérias em folhas submersas em decomposição (Duarte, 2008).

Com o desenvolvimento de técnicas para a análise de sequências de rDNA 16S em amostras naturais houve um progresso significativo na detecção e identificação de bactérias na natureza, confirmando deste modo as suspeitas de que apenas uma pequena percentagem de espécies de bactérias tinha sido isolada em cultura (Ferris *et al.*, 1996).

Designa-se por rDNA a região do DNA que codifica o gene de RNA ribossomal (figura 1) (Lane *et al.*, 1985).

Um dos métodos moleculares mais usados para a caracterização das comunidades microbianas em amostras ambientais é o *fingerprinting* genético, que permite a obtenção de um perfil de bandas que fornece informação sobre a diversidade de espécies presentes na amostra (Aboim *et al.*, 2004). Nestes estudos, são focados marcadores moleculares, isto é, sequências de DNA que permitem inferir sobre a identidade de determinado organismo. Um dos marcadores moleculares mais usados em ecologia microbiana é o rDNA, ou seja, o gene que codifica para o RNA ribossomal (Lane *et al.*, 1985).



representação esquemática do gene de rDNA (adaptado de Abreu, 2004).

Os ribossomas procariotas são constituídos por duas subunidades ribossomais que possuem moléculas de rRNA de diferentes tamanhos (Abreu, 2004). A subunidade pequena (30S) é constituída por rRNA denominado 16S enquanto a subunidade grande (50S) é constituída por rRNA 5S e 23S (Gouveia, 2004).

As primeiras pesquisas utilizavam moléculas de 5S, no entanto a informação contida no rDNA 5S é relativamente pequena - apenas 120 nucleótidos, o que levou Olsen *et al.* (1986) a utilizar moléculas de 16S (tem um tamanho médio de 1500 nucleótidos) e 23S (com aproximadamente 3000 nucleótidos) rDNA em estudos de ecologia microbiana, para tentar solucionar este problema (Tagliaferro, 2005). Quando totalmente ou quase totalmente analisados, ambas as moléculas contêm informação suficiente para análises filogenéticas confiáveis (Amann *et al.*, 1995). Além disso, as moléculas 16S rDNA possuem grande capacidade de armazenamento de informação (permite comparações significativas e satisfatórias), são estruturas conservadas, com uma reduzida taxa de mutação e a sua distribuição é universal (está presente no mecanismo de síntese proteica e tem a mesma função em todos os organismos) (Abreu, 2004).

1.5.1 Polimerase Chain Reaction (PCR)

A Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de Biologia Molecular que permite replicação *in vitro* do DNA de forma extremamente rápida (Videira, 2001).

O PCR é uma metodologia que se baseia na amplificação exponencial selectiva de uma quantidade reduzida de DNA (Carrapa *et al.*, 2005). Este é usado não para replicar a cadeia inteira de DNA, mas apenas a sequência de interesse (normalmente com tamanhos entre 100 e 600 pares de bases) que é única no organismo que se pretende estudar (Klug e Cummings, 1999).

A técnica de PCR envolve três etapas principais (figura 2) que ocorrem a temperaturas diferentes: desnaturação da cadeia de DNA, emparelhamento dos *primers* e extensão da polimerase.

1. **Desnaturação:** Este passo caracteriza-se pela desnaturação do DNA de cadeia dupla (dsDNA), isto é, a cadeia dupla transforma-se em duas cadeias simples (ssDNA). Para que este passo seja realizado, é necessário uma temperatura de 94-95°C para que se quebrem as ligações de hidrogénio (Sharma *et al.*, 2002).
2. **Emparelhamento dos *primers*:** Esta etapa consiste no emparelhamento de dois *primers* com a cadeia de DNA complementar, designados reverse e forward consoante a cadeia do DNA molde a que se ligam.

A temperatura desta etapa varia de 37°C a 65°C, dependendo da sequência dos *primers* (Videira, 2001).

3. **Extensão da polimerase:** Após a ligação dos *primers* às sequências complementares de DNA, a temperatura eleva-se a aproximadamente até os 72 °C e a enzima DNA polimerase (tipicamente Taq polimerase) sintetiza uma cadeia complementar ao ssDNA molde através da adição de bases à extremidade 3' de cada um dos *primers*. A Taq polimerase é uma polimerase de DNA termo-estável recombinante do organismo *Thermus aquaticus*, que, ao contrário de outras polimerases, se mantém activa a temperaturas elevadas (Carrapa *et al.*, 2005).

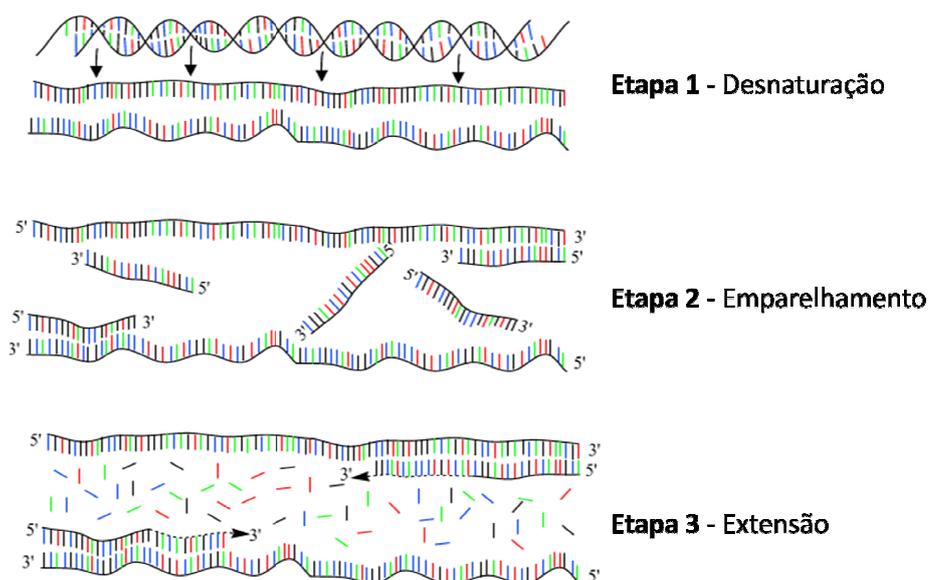
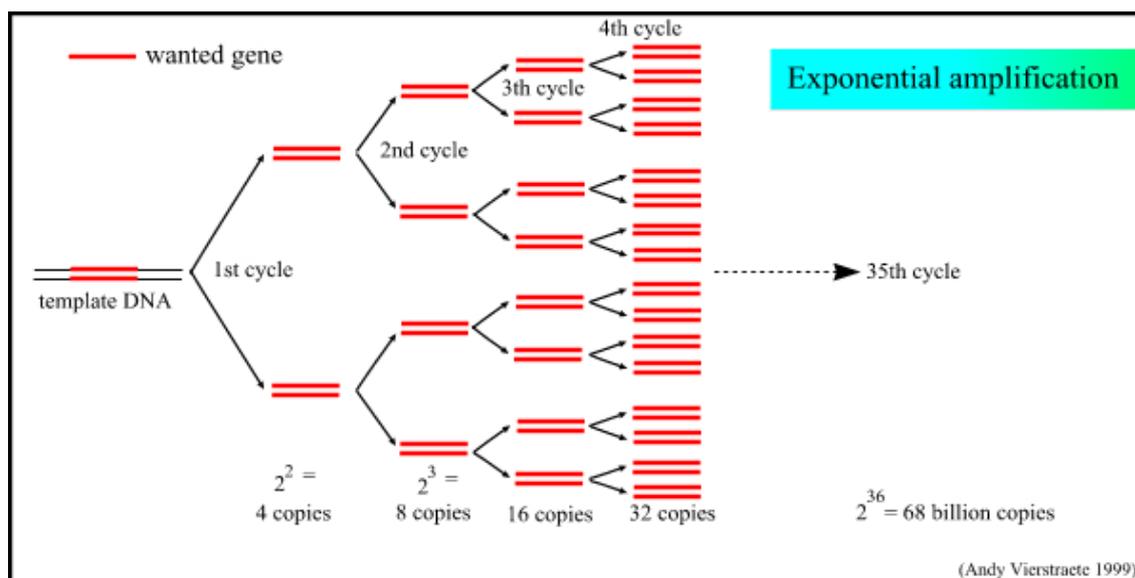


Figura 2 - Representação esquemática das principais etapas que ocorrem durante o PCR (adaptado de <http://users.ugent.be/~avierstr/index.html>).

Com um ciclo, um único segmento de DNA de cadeia dupla (dsDNA) é amplificado em duas cadeias simples de DNA (ssDNA). Assim, estas duas cadeias simples estão então disponíveis para a amplificação no próximo ciclo, e como os ciclos são repetidos, mais e mais cópias são geradas e o número de cópias do molde é aumentado exponencialmente (figura 3) (Willey *et al.*, 2008)



› durante o PCR

Este processo tem lugar num termociclador, um equipamento que controla e alterna as temperaturas durante períodos programados de tempo para o número apropriado de ciclos de PCR (geralmente entre 30 e 40 ciclos) (Willey *et al.*, 2008).

Para ocorrer amplificação de DNA utilizando a técnica de PCR é necessário que em cada reacção exista um conjunto de reagentes: amostra de DNA, *Primers* específicos, desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), DNA polimerase, MgCl₂ e Tampão (Sharma *et al.*, 2002).

Amostra de DNA - DNA modelo para a amplificação.

Primers específicos - São um conjunto de oligonucleotidos (entre 20 e 30 bases) com uma sequência específica que é complementar à do DNA modelo, que vai proporcionar o início da replicação. Numa reacção de PCR são incluídos dois *primers*, um para cada cadeia simples de ADN que foi produzida durante o passo de desnaturação.

dNTPs - Nucleótidos em solução.

MgCl₂ - Os iões Mg²⁺ funcionam como co-factor da Taq polimerase, logo é necessário a sua presença para o funcionamento da Taq.

Tampão - Proporciona o pH adequado ao funcionamento da Taq polimerase.

Taq Polimerase - Enzima responsável pela replicação do DNA pela adição de nucleótidos à cadeia modelo.

1.5.2 Electroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

A técnica de electroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) possibilita a separação das moléculas de DNA de acordo com suas sequências de pares de bases, e não de acordo com o tamanho dos fragmentos de DNA, como a maioria das técnicas de *fingerprint* genético (Aboim *et al.*, 2004).

Neste tipo de electroforese, o gradiente desnaturante (linear) resulta da combinação de duas soluções (High solution e Low solution) contendo acrilamida (estruturante), que diferem na quantidade de desnaturante (ureia e formamida) (Muyzer e Smalla, 1998).

A separação de diferentes fragmentos de DNA de cadeia dupla baseia-se na alteração da mobilidade electroforética dos fragmentos à medida que migram através do gradiente crescente de desnaturantes de DNA (Muyzer e Smalla, 1998). Os fragmentos de DNA iniciam a sua migração no gel desnaturante na forma de cadeia dupla, mas à medida que encontram concentrações crescentes de desnaturante sofrem uma alteração da sua conformação helicoidal (figura 4a) para uma forma parcialmente desnaturada o que provoca uma diminuição acentuada da mobilidade da molécula (Muyzer *et al.*, 1993).

A migração das diferentes amostras no gel origina deste modo um padrão de bandas (figura 4b), em que teoricamente cada banda no gel representa uma espécie ou um grupo de espécies de bactéria (Aboim *et al.*, 2004).

É importante referir que as moléculas de DNA não desnaturam completamente, uma vez que se a desnaturação fosse total, o produto de PCR iria continuar a correr pelo gel como uma cadeia simples de DNA. De forma a impedir que esta situação aconteça é adicionado ao final 5' de um dos primers do PCR o que se chama de GC-clamp (extensão de DNA de 40 a 60 nucleótidos composto por citosina e guanina), que proporciona um produto com um final com um domínio de fusão muito elevada (Muyzer *et al.*, 1993).

Portanto, um produto de PCR contendo GC-clamp quando corre no gel é parcialmente desnaturado, pois cada fragmento adquire a forma de Y que fica firme na sua posição no gel (Duarte, 2008).

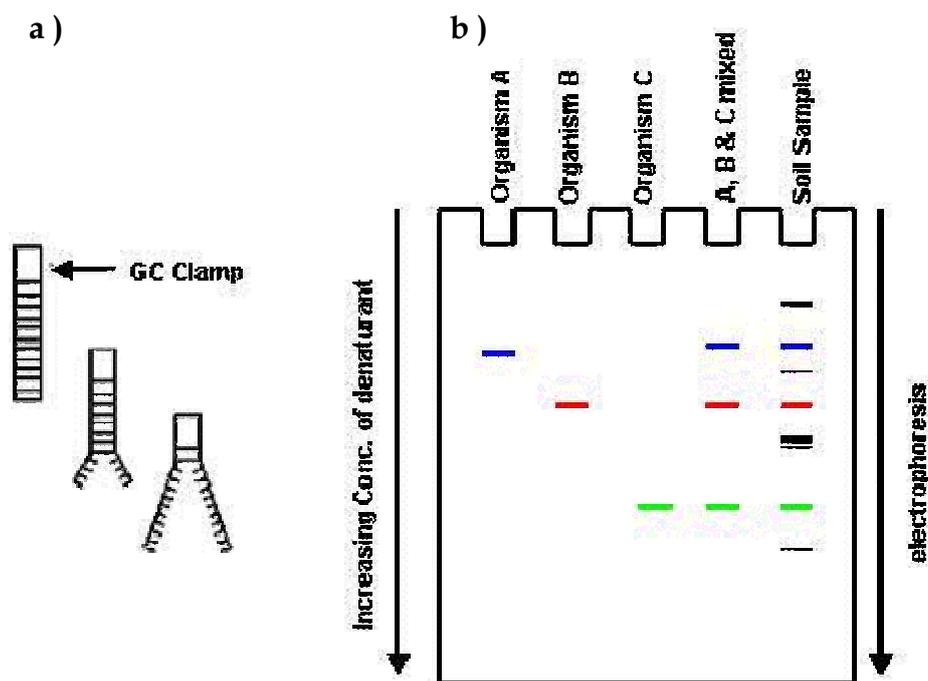


Figura 4 - Representação esquemática de: a) desnaturação da amostra ao longo do gel b) padrão de bandas no gel (adaptado de <http://www.environmental-expert.com>)

Após a electroforese, a coloração do gel recorrendo à utilização de brometo de etídeo ou nitrato de prata permite revelar o padrão de bandas (Muyzer e Smalla, 1998).

Actualmente, o DGGE é uma ferramenta molecular bem estabelecida em microbiologia ambiental que permite o estudo da complexidade e do comportamento de comunidades microbianas. A técnica é confiável, reprodutível, rápida (Nakatsu *et al.*, 2000; Ercolini, 2004; Kirk *et al.*, 2004; Edenborn e Sexstone, 2007) e barata (Gong *et al.*, 2004). Para além disso, o DGGE permite a análise simultânea de várias amostras, permitindo deste modo acompanhar as mudanças na comunidade ao longo do tempo e identificar numericamente os membros dominantes da comunidade (Torsvik *et al.*, 1998). Uma característica adicional dessa técnica é a possibilidade de posteriormente ser possível obter informações taxonómicas uma vez que as bandas podem ser removidas e sequenciadas (Muyzer, 1999).

As principais desvantagens da utilização do DGGE, à semelhança de outras técnicas de DNA *fingerprinting* dependentes do PCR, está associada à ocorrência de artefactos durante o PCR (quimeras, erros na amplificação, formação de heteroduplex e amplificação preferencial) e à eficiência da extracção (Kirk *et al.*, 2004).

Alem disso, o DGGE apenas permite detectar grupos que representem mais de 1% da totalidade das sequências presentes na amostra (Duarte, 2008). Outra desvantagem é o facto de que cada banda pode não representar necessariamente uma espécie e é possível que a heterogeneidade intra-específica de genes rRNA possa dar origem a vários padrões de bandas para uma espécie (Jackson *et al.*, 2000).

1.6 Estudos sobre a diversidade das comunidades bacterianas na decomposição foliar

Apesar da existência de alguns estudos relativos à decomposição de *Phragmites australis* em sistemas de transição já terem sido efectuados, como é o caso do estudo realizado por Quintino *et al.* (2009), a informação sobre as comunidades bacterianas associadas à decomposição das folhas nestes sistemas é muito escassa, não tendo sido encontrada qualquer bibliografia referente a este assunto. A maioria dos estudos realizados acerca do papel da comunidade microbiana decompositora que coloniza folhas submersas, ocorrem em rios e utilizam as biomassas fúngicas e bacterianas ou a produtividade.

Um estudo recente (Das *et al.*, 2007) realizado em ambiente de água doce, sugere que os microrganismos presentes na decomposição das folhas são generalistas, isto porque estão aptos para explorar de forma eficiente qualquer tipo de substrato. Os resultados sugerem que quando sujeitas às mesmas condições, folhas com diferentes características químicas, apresentam comunidades microbianas muito semelhantes, indicando deste modo, que a composição química da folha (qualidade) é menos importante que o estágio de

decomposição. Contudo, apesar da semelhança nas comunidades microbianas (e também nas comunidades de macroinvertebrados), os dois tipos de substratos apresentam taxas de decomposição muito diferentes. Isto sugere que as diferenças na decomposição devem ser causadas por diferenças na fragmentação física (devido às características das folhas, como a consistência), ou diferenças na actividade dos microorganismos (produção de enzimas, produção secundária, etc), ao invés de diferenças das comunidades biológicas (Das *et al.*, 2007).

Relativamente à colonização da comunidade bacteriana ao longo da decomposição das folhas submersas em rios, resultados indicam que ocorre uma sucessão ecológica da comunidade bacteriana com aumento do número de ribotipos em fases posteriores da decomposição (dia 56) (Duarte *et al.*, 2009). Contudo, estudos mais prolongados (181 dias de submersão máxima), sugere que as comunidades mostram uma sucessão ecológica em que alguns dos ribotipos comuns desaparecem das folhas em fases posteriores de decomposição, provavelmente devido a uma incapacidade de explorar o espaço físico limitado e recursos nutricionais disponíveis naquele momento (Das *et al.*, 2007).

1.7 A Ria de Aveiro

A Ria de Aveiro (Figura 5) é um estuário situado a Noroeste da costa atlântica de Portugal (40 ° 38'N, 8 ° 45'W). Este estende-se pelo interior, paralelamente ao mar, numa distância de 45 km com uma largura máxima de 10 km, no sentido Este-Oeste, desde Ovar até Mira (Dias *et al.*, 2001).

Na primavera cobre uma área de 83 km² na maré-alta, que é reduzida para 66 km² na maré baixa (Dias *et al.*, 2001). Contacta com Oceano Atlântico através de um canal artificial na parte ocidental, onde ocorre a troca de água através de um sistema de marés (Cerejo *et al.*, 2007).

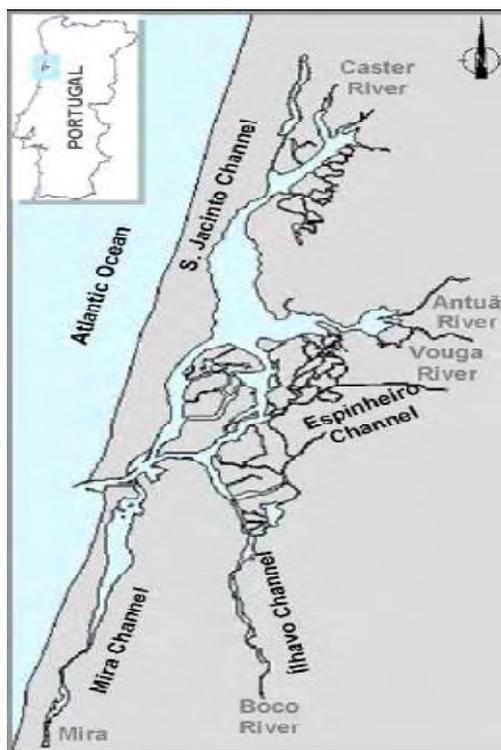


Figura 5 - Localização geográfica da Ria de Aveiro (Adaptado de Rodrigues *et al.*, 2009).

A batimetria mostra que a Ria de Aveiro tem uma profundidade média de 1 m, contudo o canal mais perto da entrada é o mais profundo com aproximadamente 20m de profundidade (Lopes e Dias, 2007).

Tem uma geometria complexa e irregular, composta por longos e estreitos canais organizados com sucessivas ramificações que se estendem desde a entrada (Cerejo e Dias, 2007).

Os inúmeros canais que constituem o estuário são reduzidos a quatro “braços” principais irradiados a partir da entrada do mar: S. Jacinto, Ílhavo, Espinheiro e Mira (Cerejo *et al.*, 2007).

O canal de S. Jacinto tem cerca de 29 km de comprimento e é o mais importante canal relativamente à média largura e comprimento. O canal de Ílhavo é dos principais canais o mais estreito e curto, e tem um comprimento de aproximadamente 15 km. Espinheiro é também um canal curto com cerca de 17 km de comprimento (Dias *et al.*, 2001), onde deságuam o rio Vouga ($50 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ de corrente média) e Antuã ($5 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$), principais fontes de água doce do estuário

(Dias *et al.*, 2000 in Lopes e Dias, 2007), sendo o Rio Vouga responsável por cerca de 66% da entrada de água doce (Vaz *et al.*, 2007). Por fim, o canal de Mira, constitui um braço alongado e raso com cerca de 20 km de comprimento. Este canal é o segundo maior canal em termos de largura média, que corre para sul em relação à boca e paralelamente à costa.

2. Objectivos

Este trabalho foi desenvolvido com o objectivo de estudar as comunidades bacterianas que se instalam em folhas em decomposição de *Phragmites australis* submersas ao longo de um gradiente de salinidade.

3. Metodologia

3.1 Área de Estudo

Este trabalho decorreu na Ria de Aveiro, mais propriamente no canal de Mira, que pode ser mesmo considerado como um pequeno estuário (Moreira *et al.*, 1993). Recebe continuamente entrada de água doce no extremo sul do canal, que provém de um pequeno sistema de lagoas e rios ligados por uma pequena barragem chamada Barrinha de Mira (Cerejo *et al.*, 2007).

Em termos de salinidade este canal pode-se dividir em 3 secções: secção com salinidades que variam entre marés de valores superiores a 18 até 30-35, durante a maior parte do ano (boca do estuário); uma secção com uma grande variabilidade (zona intermédia do estuário); e uma secção onde a salinidade não é maior que 0,1, durante todo o ano (zona final do estuário) (Abrantes *et al.*, 1999).

Ao longo do canal de Mira foram definidos 6 pontos de amostragem distribuídos por 3 áreas, A, C e E, como mostra a figura 6. A área A, localiza-se a jusante, com salinidades mais elevadas, a área C, localiza-se a meio do canal,

com valores de salinidades variáveis, e a área E, a montante do canal onde os valores de salinidades são próximos de zero (Quintino *et al.*, 2009).



Figura 6 - Distribuição dos pontos de amostragem para cada área ao longo do Canal de Mira.

3.2 Colheita e preparação das folhas de *Phragmites australis*

As folhas de *Phragmites australis* colhidas em Novembro de 2008 foram sujeitas a um processo de pré-secagem. Esta fase consiste em envolver as folhas de *Phragmites australis* em papel absorvente e colocá-las num prensa de secagem (figura 7) durante aproximadamente 3 semanas, renovando o papel absorvente de dois em dois dias.

O objectivo deste processo é evitar que na estufa haja uma perda repentina da humidade, para que as folhas não enrolem e a área da superfície da folha se mantenha inalterada antes e após secagem.

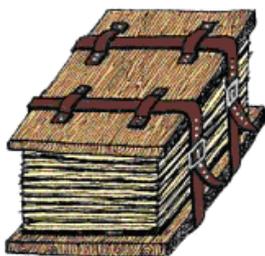


Figura 7 - Figura representativa de uma prensa de secagem (adaptado de http://www.terrasdemouros.pt/poca_herbario.asp).

Após a pré-secagem as folhas foram secas em estufa, a 60°C durante 72 horas para perderem toda a humidade restante e posteriormente conservadas numa câmara frigorífica a uma temperatura de 5°C até serem utilizadas.

Por último, foram pesadas $3 \pm 0,005\text{g}$ de folhas de *Phragmites australis* (figura 8) e colocadas dentro de sacos de nylon com uma malha de 5 mm (figuras 9).



Figura 8 - Pesagem das folhas de *Phragmites australis*.



Figura 9 - Saco de nylon de malha 5mm com as folhas de *Phragmites australis*.

3.3 Colocação e recolha dos sacos com *Phragmites australis* no canal de Mira

Em cada área de estudo foram submersos 20 sacos, correspondentes a 4 réplicas por cada dia de recolha (3°, 7°, 15°, 30° e 60° dia após serem submersas). Nas figuras 10 e 11 é possível observar a disposição dos sacos após submersos em cada estação.

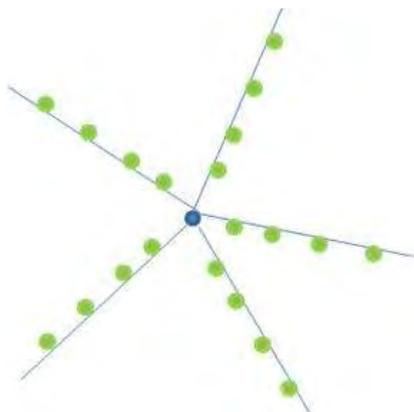


Figura 10 - Disposição dos sacos de *Phragmites australis* após submersão em cada ponto de amostragem.



Figura 11 - Sacos de *Phragmites australis* submersos na Ria.

O trabalho de campo decorreu durante o mês de Janeiro, Fevereiro e Março de 2009:

3º dia de Recolha: 12 de Janeiro

7º dia de Recolha: 16 de Janeiro

15º dia de Recolha: 24 de Janeiro

30º dia de Recolha: 8 de Fevereiro

60º dia de Recolha: 10 de Março

Nos dias de recolha, cada saco de nylon com as amostras de folhas, foi individualmente colocado dentro de sacos de plástico com um pouco de água e transportados até ao laboratório.

3.4 Processamento laboratorial das amostras

No laboratório, as amostras foram lavadas com água destilada para remover a macrofauna presente e o excesso de sedimento. Nesta fase tomou-se bastante cuidado na manipulação das amostras para evitar contaminações, pelo que todo o material utilizado foi esterilizado. Após a lavagem, as amostras

foram guardadas no congelador a uma temperatura de -40°C até posterior análise. A análise foi efectuada através de métodos moleculares envolvendo extracção de DNA, PCR (Polymerase Chain Reaction) e DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

3.4.1 Extracção de DNA e PCR

Para a extracção de DNA, pesou-se aproximadamente 50mg das folhas congeladas e o DNA foi isolado utilizando o kit PowerSoil DNA extraction de acordo com as instruções de uso do mesmo.

O PCR foi realizado num MJ Mini Thermal-cycler, da Citomed (Figura 12). Para o primeiro PCR foram utilizados o par de primers universais 27F e 1494R, seguindo o protocolo estabelecido por Weisburg *et al.* (1991), com algumas alterações.

Para o segundo PCR foram utilizados o par de primers 968GC - 1401R seguindo o protocolo estabelecido por Nubel *et al.* (1996) com algumas alterações, obtendo-se um fragmento desde a posição 968 (5'-GC-clamp-AAC GCG AAGAAC CTT AC -3') à 1401 (5'- GCG TGT GTA CAA GAC CC -3'), isto é, um fragmento com 433pb. Estes primers amplificam a região V6-V8 do gene 16S de bactérias (Ferris *et al.*, 1996), para posteriormente ser possível o estudo da diversidade bacteriana recorrendo à técnica de DGGE.

O controlo positivo e negativo foram sempre realizados em cada análise de PCR.



Figura 12 - MJ Mini Thermal-cycler (Citomed).

As reacções de PCR foram feitas com um volume final de 25 µl, contendo 1 µl de DNA, 10 µM de cada primer, tampão diluído 1x, 25mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP's (Promega) e 0,5u de Taq DNA Polymerase (Fermentas). Os volumes para cada reacção de PCR estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Volume dos reagentes necessários em µl para uma reacção de PCR com um volume final de 25 µl: a) para o primeiro PCR b) para o segundo PCR

a)		b)	
ddH ₂ O	13.25	ddH ₂ O	14.5
BSA (2mg/mL)	0.5	Acetamida	0.5
Tampão (10x)	2.5	Tampão (10x)	2.5
MgCl ₂ (25mM)	3	MgCl ₂ (25mM)	3
dNTP (2mM)	2.5	dNTP (2mM)	2.5
Primer 27F (10µM)	0.25	Primer 968GC (10µM)	0.25
Primer 1494 R (10µM)	0.25	Primer 1401 R (10µM)	0.25
Taq (1u/µl)	0.5	Taq (1u/µl)	0.5
DNA	1	DNA	1

Para o 1º PCR, o programa de amplificação começa com uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação durante 45 segundos a 94°C, o emparelhamento de primers durante 45 segundos a 56°C, e extensão durante 1min30s a 72°C. Termina com uma extensão final de 10min a 72°C.

Para o 2º PCR, o programa de amplificação começa com uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguido de 34 ciclos de desnaturação durante 1minuto a 95°C, o emparelhamento de primers durante 1minuto a 53°C, e extensão durante 1min30s a 72°C. Termina com uma extensão final de 7min a 72°C.

Após serem feitos os PCR's, as amostras destes foram sempre corridas numa electroforese para verificar se a extracção foi bem feita e se não houve contaminação na fase da amplificação (PCR).

3.4.2 DGGE

O DGGE envolve uma série de etapas até se obter o padrão de bandas relativamente à comunidade bacteriana. Estas etapas iniciam-se na preparação das soluções (de desnaturante) para o gel, passam pela corrida do gel e finalizam-se com a coloração e digitalização deste.

3.4.2.1 Preparação das soluções

Foram feitas duas soluções com um volume de 14,5ml cada, uma com baixa concentração de desnaturante (solução Low) e uma com uma alta concentração de desnaturante (solução High). O gradiente de desnaturação utilizado foi de 32% e 69% (100% desnaturante corresponde a 40% de formamida e 7 M de ureia), de acordo com os valores indicados na tabela 2.

Tabela 2 - Valores utilizados na preparação de um gel com um gradiente de desnaturação de 32% e 69%.

	Low (32%)	High (69%)
TAE 50x	290 µl	290 µl
Ureia	1,9503 g	4,24 g
Formamida	1,856 ml	4,034 ml
Acrilamida	2,9 ml	4,35 ml
ddH2O	Até 14,5 ml	Até 14,5 ml

3.4.2.2 Polimerização do gel

Adiciona-se a cada uma das soluções 85 µl de APS (Ammonium Persulfate Solution) e 30 µl de Temed (N,N,N',N' -tetramethylenediamine) e agita-se cuidadosamente. Estes reagentes iniciam a polimerização da acrilamida.

3.4.2.3 Corrida do gel

Prepara-se aproximadamente 25L de TAE 1X (tampão Tris-Acetato-EDTA) para a câmara do aparelho de DGGE e inicia-se o aquecimento do mesmo até uma temperatura de 60°C. Quando o tampão estiver a 60°C montam-se os géis na frame e estes são colocados na câmara. É sempre feita uma pré-corrida para preparar o gel antes da corrida propriamente dita, que dura 10 minutos a 220V.

Após a pré-corrída são carregadas as amostras que contêm o produto de PCR com 433pb (volume variável, depende da intensidade das bandas na electroforese) e tampão de carga (5 µl). A corrída é feita à temperatura de 60°C, a 150V durante 16 horas.

3.4.2.4 Coloração do gel

Após a corrída os géis são retirados para um recipiente contendo uma solução de TAE 1x.

A coloração utilizada foi baseada na metodologia de Byun *et al.* (2009), que consiste na passagem dos géis por sucessivas soluções (solução de coloração, solução de desenvolvimento e solução stop) até ser atingido o resultado final.

Solução de coloração (para 1 gel)

Preparação : 0,3g de nitrato de prata

750 µl de ácido acético

15ml de etanol a 96%

Perfazer o volume de 150ml com água miliQ

O gel deve permanecer nesta solução durante cerca de 20 minutos. Após este tempo remove-se esta solução, lava-se o gel com água destilada e adiciona-se a solução de desenvolvimento.

Solução de desenvolvimento (para 1 gel)

Preparação: 50ml de NaOH a 9%

405µl de formaldeído a 37%

Perfazer o volume de 150ml com água destilada

} a 55°C

Deve-se colocar o gel nesta solução e levá-lo a incubar a uma temperatura de 55°C. Quando todas as bandas forem visíveis no gel, normalmente após 5-10

minutos, remove-se de imediato desta solução, para que o gel não escureça demasiado.

Solução stop

Preparação : 7,5g de Na₂CO₃

1L Água destilada

Esta solução é necessária para parar a reacção, e assim o gel deve permanecer nesta solução até ser digitalizado.

3.4.2.5 Digitalização do gel

A digitalização dos géis foi feita utilizando o GS-710 Calibrated Imaging Densitometer da BioRad.

Neste trabalho os géis de DGGE foram analisados individualmente, pelo que foram feitos 8 géis de DGGE, 5 referentes às amostras de todas as áreas para cada dia de recolha (géis espaciais) e 3 referentes a cada área de amostragem para todos os dias (géis temporais). Nos géis com os dados espaciais utilizaram-se 8 amostras de cada área, um total de 24 amostras por gel, enquanto que nos géis com os dados temporais utilizaram-se 4 amostras por dia de amostragem, um total de 20 amostras por gel.

Para converter e normalizar a imagem do gel utilizou-se o programa de computador GelCompar 4.0 com uma resolução de 500 pontos.

A posição e quantificação das bandas em cada coluna (amostra) foram tratadas com uma tolerância e optimização de 4 pontos. A padronização das bandas foi feita automaticamente pelo programa GelCompar e cuidadosamente confirmada manualmente, fazendo-se alterações sempre que necessário. Posteriormente, o programa construiu uma matriz contendo as posições das bandas e transformou a intensidade de cada banda num valor de abundância. Dessa matriz obteve-se uma matriz de abundâncias relativas e uma matriz com

o número de ribotipos de cada amostra, que posteriormente foram submetidas ao PRIMER V6 para sua análise estatística.

3.5 Análise de dados

Com o objectivo de identificar e caracterizar grupos de afinidade entre as áreas de amostragem (dados espaciais) e entre dias de amostragem (dados temporais), as matrizes foram analisadas com o coeficiente de similitude de Bray-Curtis, e a matriz de similitude dos dados de abundância relativa foi examinada pelo método de escalonamento multidimensional não paramétrico (NMDS) (Clarke e Warwick, 2001). Nesta análise, as amostras que correram nas extremidades do gel de DGGE (apresentam menor qualidade), foram analisadas com alguma cautela, e removidas sempre que se justificasse (resultados muito discrepantes), tendo sido analisadas pelo menos 3 réplicas.

Posteriormente, as matrizes de similitude dos dados da abundância relativa e do número de ribotipos foram analisados de acordo com um desenho experimental hierárquico, com a área como factor fixo principal para os géis espaciais, e o tempo como factor fixo principal para os géis temporais. Para tal recorreu-se a análise de variância permutacional multivariável (Anderson, 2001) do pacote adicional PERMANOVA+ do PRIMER v6 (Anderson *et al.*, 2008). Com este desenho foi testada a hipótese nula de que não existem diferenças significativas entre as amostras, no espaço ou no tempo, para os géis espaciais ou temporais, respectivamente. Os termos significativos foram investigados à *posteriori* usando comparações entre as áreas (dados espaciais) e entre os tempos (dados temporais) recorrendo à estatística-t da PERMANOVA e permutações sujeitas a um modelo reduzido (Anderson *et al.*, 2008).

Os valores de t dos testes principais consideram que os grupos são significativamente diferentes se $t \leq 0,05$.

4. Resultados

A apresentação dos resultados está dividida em duas partes, uma relativa à análise da comunidade bacteriana entre as áreas de amostragem (A, C e E) para cada momento de amostragem e outra relativa à análise da comunidade bacteriana de cada área de amostragem ao longo do tempo.

4.1 Análise da comunidade bacteriana das três áreas (A, C e E) para cada momento de amostragem

4.1.1 Análise da abundância relativa dos ribotipos

O gel de DGGE do 3º dia mostra diferenças nas comunidades bacterianas das três áreas (figura 13). A área C apresenta uma comunidade bacteriana mais distribuída ao longo de todo o gel, enquanto que as comunidades das áreas A e E restringem-se mais à parte superior do gel. É ainda possível observar que alguns ribotipos estão presentes apenas numa área e outros estão presentes em todas mas com intensidades diferentes (setas da figura 18).

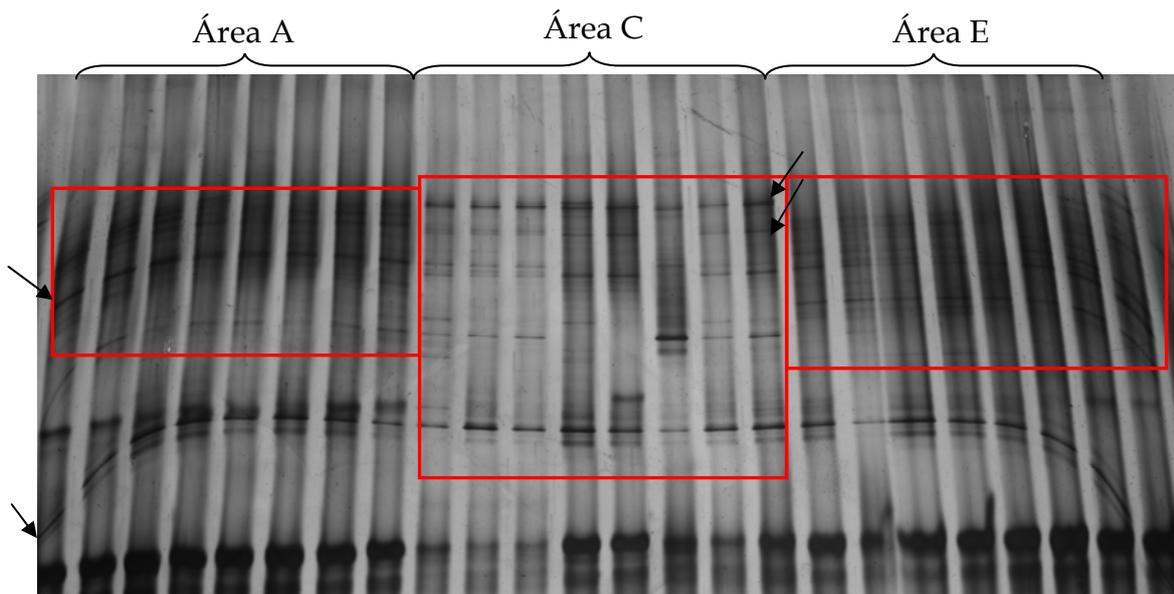


Figura 13 - Gel referente à distribuição das comunidades bacterianas nas três áreas de amostragem para o 3º dia. As setas indicam ribotipos que parecem importantes na comunidade.

□ Área de maior distribuição dos ribotipos

A tabela 3 indica que a comunidade bacteriana do 3º dia de amostragem apresenta diferenças significativas entre as três áreas (A, C e E).

Tabela 3 - PERMANOVA valores de F dos testes globais (com valores de significância associado entre parênteses) e valores de t da comparação à posteriori duas a duas (com valores de significância associado entre parênteses) para valores de abundância relativa de ribotipos entre as áreas para cada momento de amostragem.

	Dia 3	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60
Teste global	5,916 (<0,001)	4,892 (<0,001)	1,774 (0,011)	7,818 (<0,001)	6,567 (<0,001)
Comparações duas a duas					
A, C	2,397 (<0,001)	2,009 (<0,001)	1,218 (ns)	2,795 (<0,001)	3,695 (<0,001)
A, E	2,373 (<0,001)	2,102 (0,002)	1,452 (ns)	2,954 (<0,001)	2,407 (<0,001)
C, E	2,526 (<0,001)	2,478 (0,001)	1,355 (ns)	2,545 (<0,001)	1,779 (<0,001)

Pela análise de ordenação (MDS), figura 14, pode-se confirmar que a distribuição das amostras de cada área está relativamente separada.

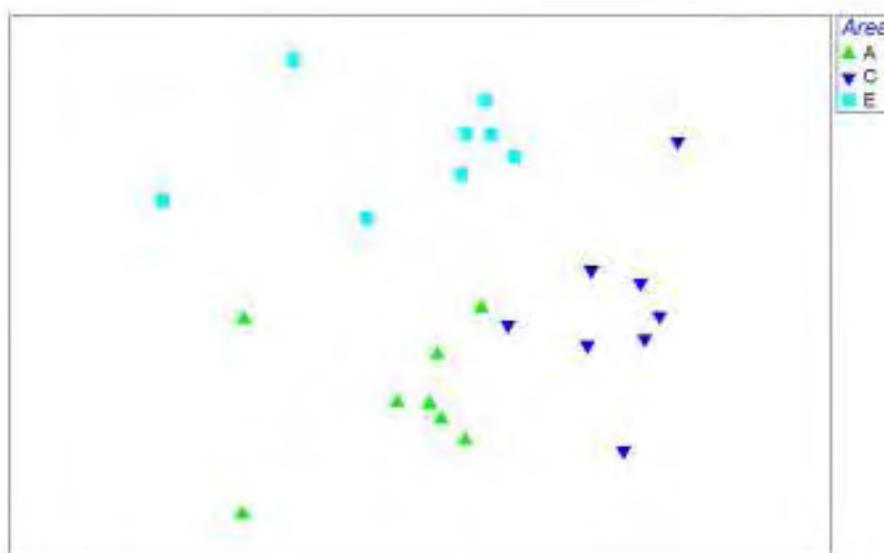


Figura 14 - Análise de ordenação da comunidade bacteriana nas três áreas de amostragem no 3º dia de recolha.

Para o 7º dia de amostragem, a análise estatística indica que existem diferenças significativas entre a comunidade bacteriana presente nas áreas A, C e E (tabela 3). A análise de ordenação dos dados mostra uma distribuição distinta das amostras relativas às três áreas (figura 15).

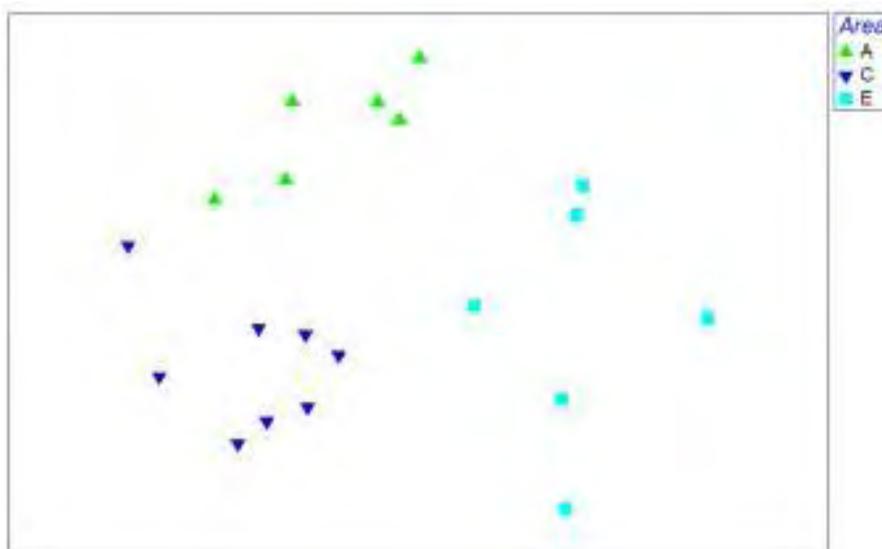


Figura 15 - Análise de ordenação da comunidade bacteriana presente nas três áreas de amostragem (A, C e E) no 7º dia.

No que diz respeito à comunidade bacteriana presente nas folhas recolhidas no 15º dia de amostragem, estatisticamente só existem diferenças entre a área A e a área E (tabela 3). Também pela figura 16, se observa que não existe uma distinção clara entre as 3 áreas de amostragem.

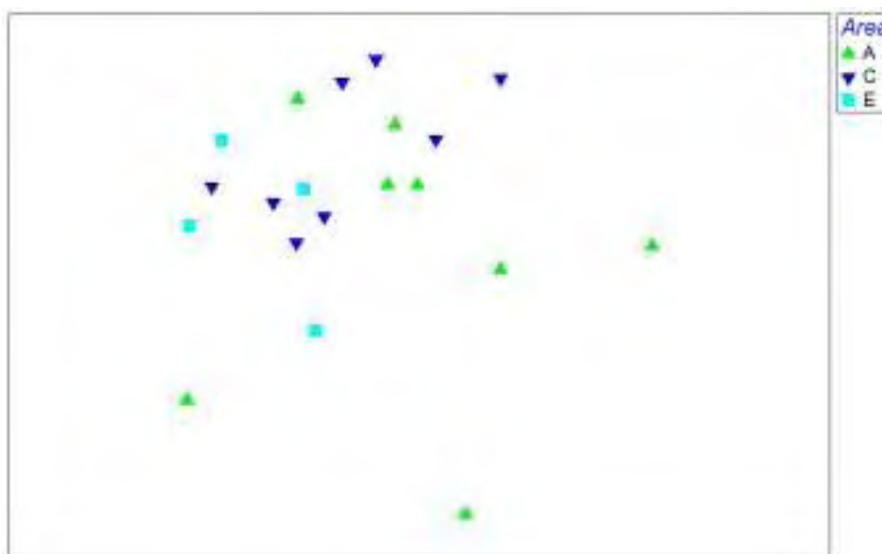


Figura 16 - Análise de ordenação da comunidade bacteriana presente nas três áreas de amostragens (A, C e E) no 15º dia de recolha.

Relativamente ao 30º dia de amostragem, estatisticamente (tabela 3) e pela análise de ordenação dos dados (figura 17) verifica-se que a comunidade bacteriana apresenta diferenças significativas entre as áreas A, C e E

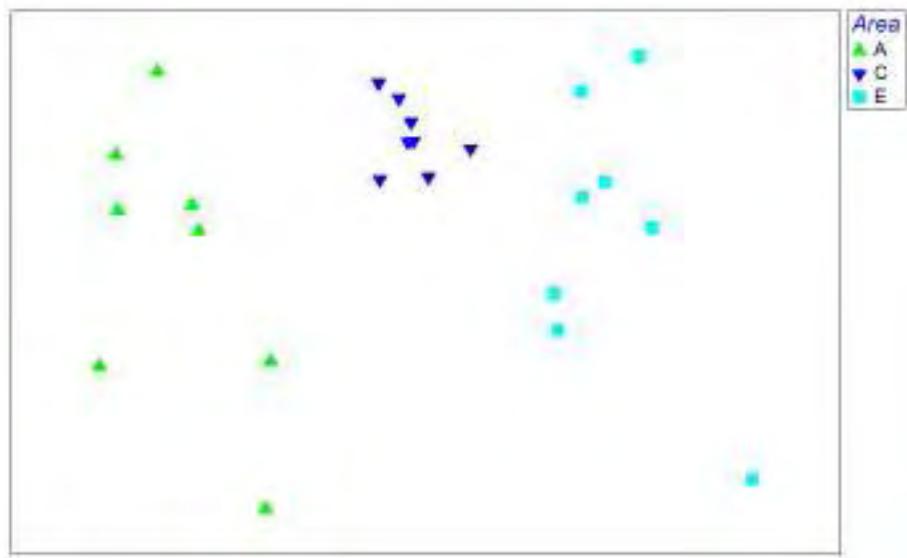


Figura 17 - Análise de ordenação da comunidade bacteriana presente nas três áreas de amostragem (A, C e E) relativamente ao 30º dia de recolha.

Na figura 18, gel de DGGE referente ao 30º dia de amostragem, as setas indicam ribotipos característicos em algumas áreas e ribotipos presentes nas três áreas mas com diferente intensidade, o que justifica as diferenças significativas entre as áreas relativamente à abundância de ribotipos.

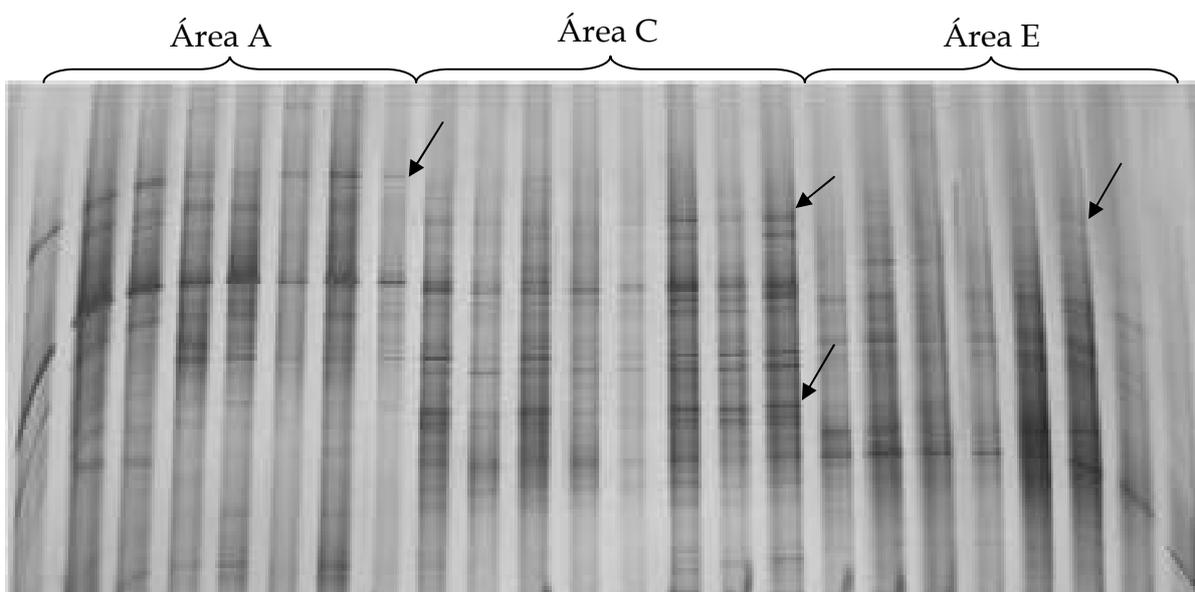


Figura 18 - Gel referente à distribuição das comunidades bacterianas nas três áreas de amostragem para o 30º dia.

Pela observação do gel de DGGE do dia 60, figura 19, pode-se verificar que a distribuição da comunidade bacteriana da área A quase que se restringe à parte superior do gel, ao contrário da área C e da área E. É ainda possível observar diferenças na intensidade de alguns ribotipos em cada área e também a existência de alguns ribotipos apenas numa área (setas da figura 19).

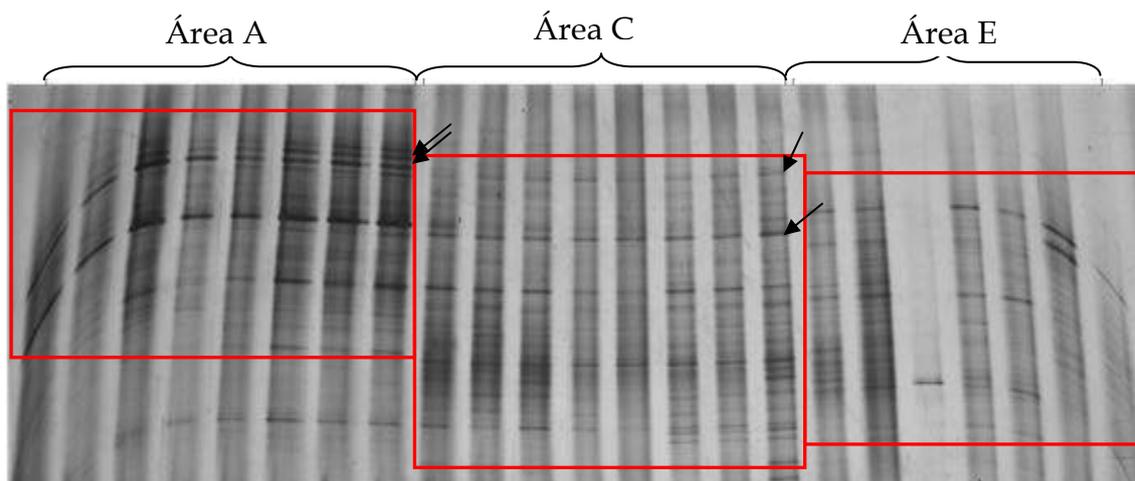


Figura 19 - Gel referente às comunidades bacterianas presentes nas amostras das três áreas de amostragem para o 60º dia. As setas indicam ribotipos que parecem importantes na comunidade.

□ Área de maior distribuição dos ribotipos.

A análise estatística indica também que existem diferenças significativas entre as comunidades bacterianas das três áreas de amostragem (tabela 3).

Na figura 20, verifica-se um isolamento de cada área, indicando que as comunidades bacterianas associadas às folhas em decomposição de cada área são diferentes.

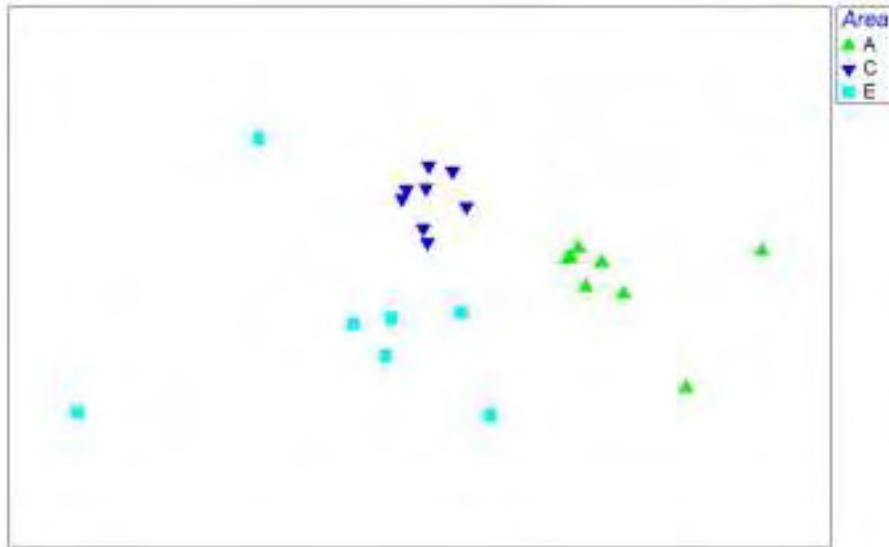


Figura 20 - Análise de ordenação da comunidade bacteriana presente nas três áreas de amostragem (A, C e E) no 60º dia de recolha.

4.1.2 Análise da riqueza em ribotipos

Através do número de ribotipos encontrados nas amostras das diferentes áreas para cada momento de amostragem, é possível verificar que existem diferenças significativas entre as comunidades bacterianas das três áreas apenas no dia 3 (tabela 4).

Tabela 4 - PERMANOVA valores de F dos testes globais (com valores de significância associado entre parênteses) e valores de t da comparação à posteriori duas a duas (com valores de significância associado entre parênteses) para valores de riqueza em ribotipos entre as áreas para cada momento de amostragem.

	Dia 3	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60
Teste Global	12,654 (0,001)	0,534 (ns)	0,396 (ns)	1,326 (ns)	3,138 (0,022)
Comparações duas a duas					
A, C	2,104 (0,044)	0,337 (ns)	0,293 (ns)	1,264 (ns)	2,032 (ns)
A, E	5,413 (<0,001)	0,666 (ns)	0,639 (ns)	1,557 (ns)	1,051 (ns)
C, E	2,770 (0,015)	1,023 (ns)	0,932 (ns)	0,405 (ns)	2,293 (0,028)

Pela observação do gel de DGGE, figura 13, e também pela tabela 5 é possível verificar que no dia 3 as amostras da área E apresentam o maior número médio de ribotipos (22,9) das três áreas. Na tabela 4, verifica-se que

existem diferenças significativas entre as comunidades bacterianas estudadas nas três áreas (tabela 4).

Tabela 5 - Média e desvio padrão associado do número de ribotipos de cada área para cada momento de amostragem.

		Dia 3	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60
Área A	Média	14,4	24,0	24,1	26,0	26,6
	Desvio Padrão	2,26	5,37	7,64	3,85	7,23
Área C	Média	17,8	23,9	25,3	29,1	32,4
	Desvio Padrão	3,65	2,64	7,23	5,17	4,14
Área E	Média	22,9	22,0	20,8	30,4	24,3
	Desvio Padrão	3,52	5,26	6,40	5,76	4,13

No 60º dia também se verificam diferenças significativas entre as comunidades bacterianas colonizadoras das folhas em decomposição, mas apenas entre as amostras da área C e E (tabela 4). Pela análise da tabela 5 é ainda possível observar que para este dia a área C apresenta uma média de 32 ribotipos.

A observação do gel referente ao dia 60, figura 19, mostra que as amostras da área C apresentam maior número de ribotipos que as das áreas A e E.

Relativamente aos restantes momentos de amostragem (7º, 15º e 30º), não se observam diferenças significativas entre a comunidade bacteriana presente nas três áreas (tabela 4).

Na figura 18, pode-se observar o gel de DGGE do dia 30, onde é possível observar que o número de ribotipos é muito semelhante nas amostras de todas as áreas.

4.2 Análise da comunidade bacteriana de cada área de amostragem ao longo do tempo

4.2.1 Análise da abundância relativa dos ribotipos

Na figura 21, gel de DGGE relativo à área A, as setas indicam alguns ribotipos únicos em determinados momentos da amostragem e outros que aparecem em quase todos os momentos, mas apresentam diferentes abundâncias. São estes ribotipos característicos (únicos num momento de amostragem ou com diferentes intensidades) que caracterizam a comunidade bacteriana presente em cada momento, pelo que é importante no futuro sequenciar estes ribotipos.

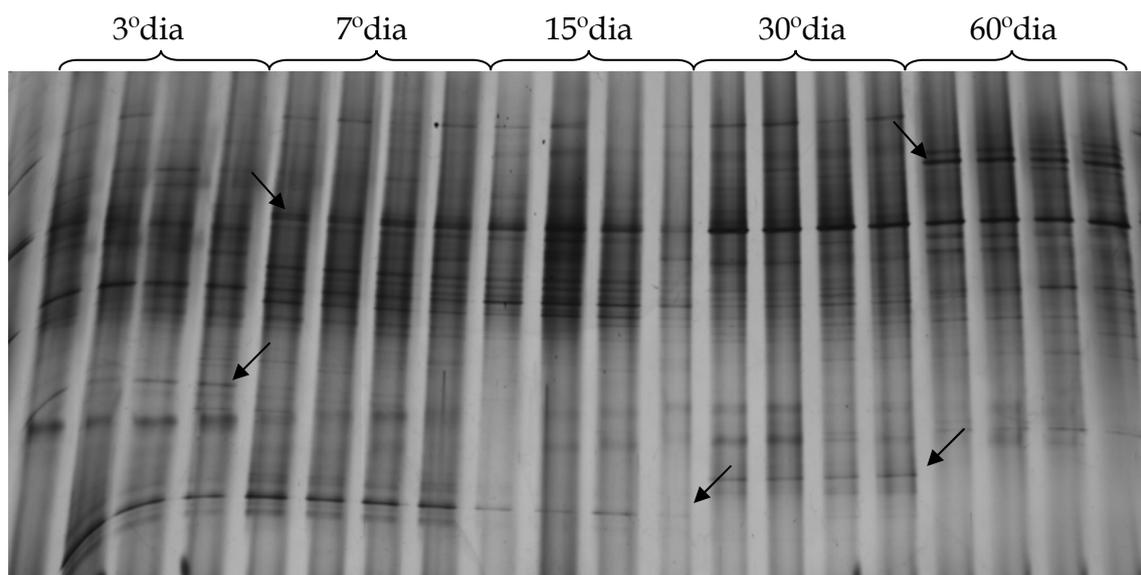


Figura 21 - Gel referente à distribuição das comunidades bacterianas da área A ao longo dos tempos de amostragem. As setas indicam ribotipos que parecem importantes na comunidade.

A análise da abundância relativa dos ribotipos das amostras da área A ao longo do tempo, mostra que não existem diferenças significativas entre o 3º e o 7º dia de amostragem, e que pelo contrário o 15º, o 30º e o 60º dia apresentam diferenças significativas na comunidade bacteriana (tabela 6).

Tabela 6 - PERMANOVA valores de F dos testes globais (com valores de significância associado entre parênteses) e valores de t da comparação à posteriori duas a duas (com valores de significância associado entre parênteses)) para valores de abundância relativa de ribotipos entre os momentos de amostragem para cada área. O sinal (-) indica ausência de amostras.

	Área A	Área C	Área E
Teste Global	4,956 (<0,001)	4,333 (<0,001)	3,645 (<0,001)
Comparações duas a duas			
3, 7	1,377 (ns)	1,749 (0,035)	1,395 (ns)
3, 15	1,775 (0,032)	2,437 (0,005)	2,000 (0,016)
3, 30	2,284 (0,009)	2,583 (0,005)	2,005 (0,013)
3, 60	1,963 (0,015)	2,367 (0,009)	-
7, 15	2,016 (0,016)	2,003 (0,016)	2,038 (0,016)
7, 30	3,182 (0,002)	2,256 (0,009)	2,445 (0,006)
7, 60	2,878 (0,003)	2,252 (0,009)	-
15, 30	2,355 (0,008)	1,461 (ns)	1,471 (ns)
15, 60	2,396 (0,007)	1,601 (ns)	-
30, 60	2,163 (0,010)	1,534 (ns)	-

Na figura 22 pode-se confirmar que a distribuição das amostras do dia 3 e do dia 7 está muito próxima.

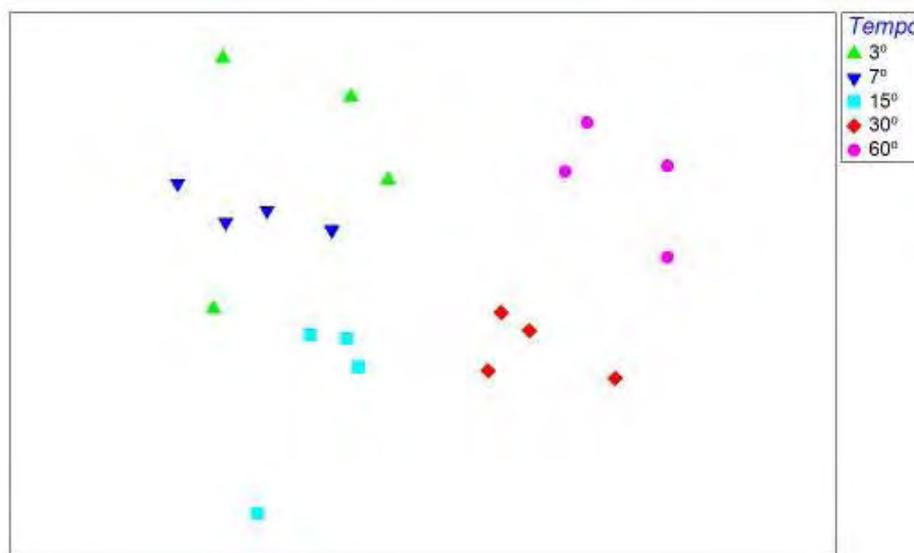


Figura 22 - Análise de ordenação da comunidade bacteriana na área de amostragem A ao longo dos 5 tempos de amostragem (3º, 7º, 15º, 30º e 60º dia).

Na figura 23, gel de DGGE referente à área C, observa-se a ocorrência de ribotipos característicos em alguns dos momentos de amostragem (identificados

pelas setas) que seriam importantes identificar (sequenciação) para tentar caracterizar esta comunidade.

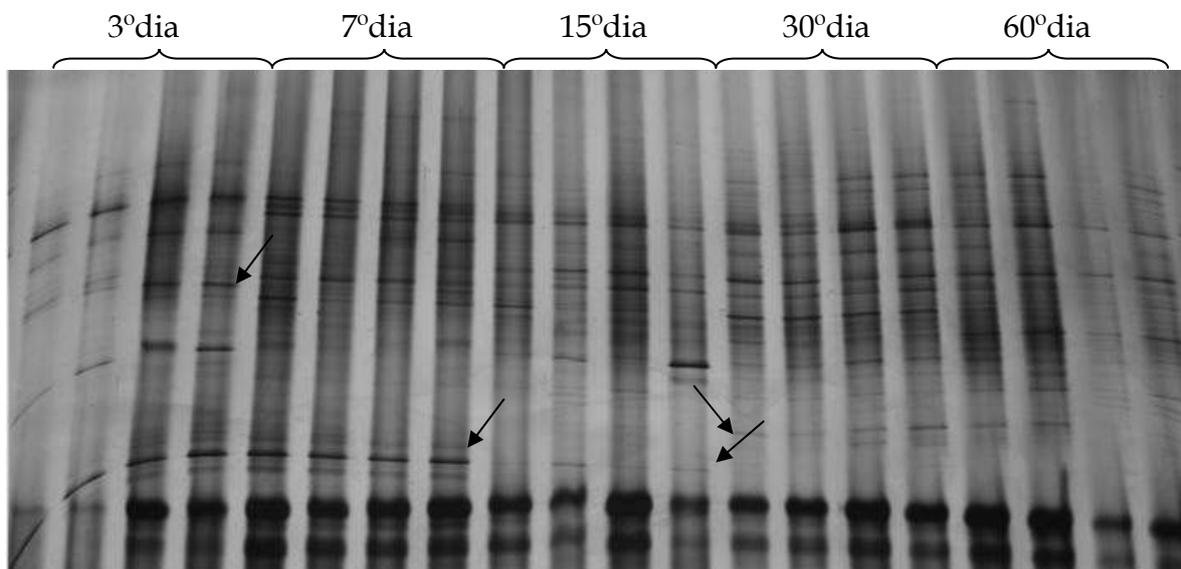


Figura 23 - Distribuição das comunidades bacterianas ao longo dos tempos de amostragem para a área C. As setas indicam ribotipos que parecem importantes na comunidade.

Pela figura 24, referente à área de amostragem C, nota-se um distanciamento entre as comunidades bacterianas associadas às folhas em decomposição do dia 15, 30 e 60 e as do dia 3 e 7. A análise estatística comprova esta separação, indicando ainda que entre o dia 3 e 7 a comunidade bacteriana apresenta diferenças significativas e que entre os dias 15, 30 e 60 não existem diferenças (tabela 6).

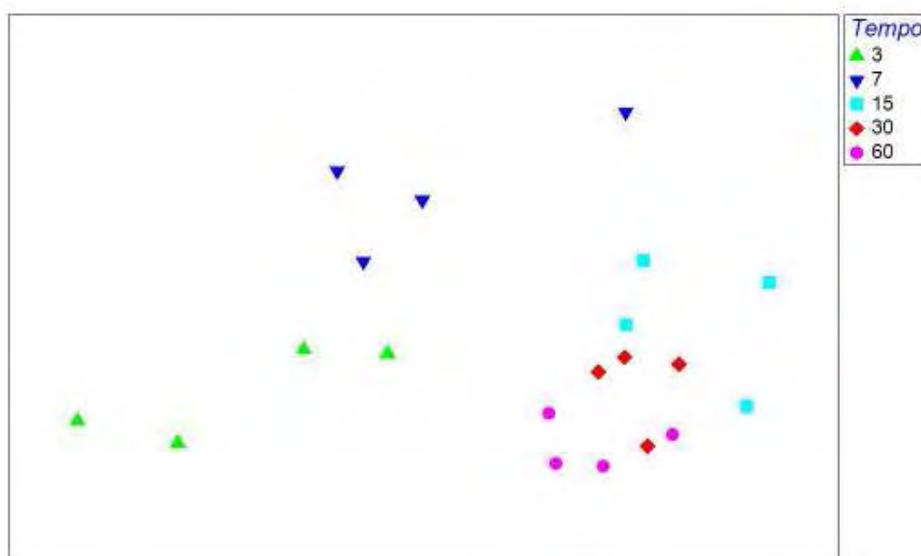


Figura 24 - Análise de ordenação da comunidade bacteriana na área de amostragem C ao longo do tempo.

Quanto à análise da comunidade bacteriana da área E, apenas foi possível apresentar neste trabalho dados referentes ao dia 3, 7, 15 e 30. A análise estatística indica que entre o 3º e o 7º dia e o 15º e o 30º dia não existem diferenças significativas na comunidade bacteriana, havendo contudo diferenças significativas entre os dois grupos (tabela 6).

Pela figura 25, pode-se observar que na área de amostragem E, as comunidades bacterianas formam dois grupos distintos, um grupo que engloba o 3º e 7º dia de amostragem e outro que engloba o 15º e 30º dia.

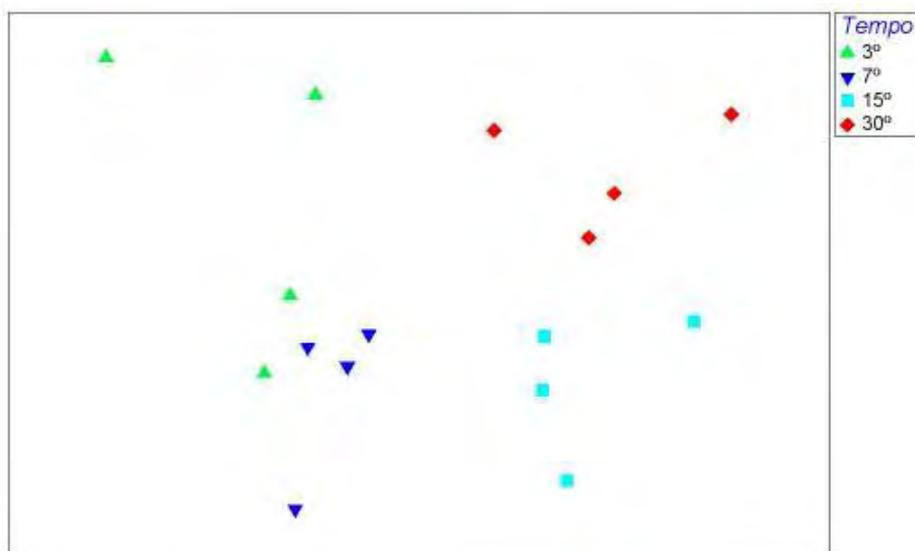


Figura 25 - Análise de ordenação da comunidade bacteriana na área de amostragem E ao longo do tempo (à exceção do dia 60).

4.2.2 Análise da riqueza em ribotipos

Através da análise da riqueza em ribotipos, verifica-se que a área A não apresenta diferenças significativas entre os dias de amostragem, com a exceção do 15º dia que é diferente de todos os restantes tempos (tabela 7).

Tabela 7 - PERMANOVA valores de F dos testes globais (com valores de significância associado entre parênteses) e valores de t da comparação à posteriori duas a duas (com valores de significância associado entre parênteses) para os valores de riqueza de ribotipos entre os momentos de amostragem para cada área. O sinal (-) indica ausência de amostras.

	Área A	Área C	Área E
Teste Global	8,478 (0,001)	5,207 (0,001)	1,273 (ns)
Comparações duas a duas			
3, 7	0,619 (ns)	1,595 (ns)	0,127 (ns)
3, 15	2,892 (0,025)	1,656(ns)	2,048 (ns)
3, 30	0,335 (ns)	2,553 (0,037)	0,530 (ns)
3, 60	0,913 (ns)	2,856 (0,024)	-
7, 15	6,095 (0,001)	0,370 (ns)	2,100 (ns)
7, 30	1,773 (ns)	3,229 (0,016)	0,468 (ns)
7, 60	0,624 (ns)	3,989 (0,007)	-
15, 30	4,780 (0,003)	2,114 (ns)	0,957 (ns)
15, 60	6,565 (0,001)	2,809 (0,036)	-
30, 60	2,400 (ns)	0,931 (ns)	-

Através da análise visual do gel da área A ao longo dos 5 momentos de amostragem (figura 21), no que respeita ao número de ribotipos, o 15º dia é o dia que apresenta menor número de ribotipos, não se notando grandes diferenças entre os restantes dias.

Para a área C, constata-se que não existem diferenças significativas entre os dias de amostragem mais próximos, como o 3 e 7, 7 e 15, 15 e 30, 30 e 60 (tabela 7). Para além destes dias, apenas se verifica não existir diferenças significativas entre o 3º e 15º dia.

Pela observação do gel da área C ao longo dos 5 momentos de amostragem (figura 23), é possível verificar um aumento considerável no número de ribotipos nos últimos 2 momentos de amostragem, isto é no 30º e 60º dia. Pode-se ainda observar a ocorrência de ribotipos característicos em alguns dos momentos de amostragem (identificados pelas setas da figura 23) que seriam importantes identificar (sequenciação) para tentar caracterizar esta comunidade.

Na tabela 8, é possível ainda verificar que na área C ocorre um aumento gradual no número médio de ribotipos ao longo da amostragem.

Tabela 8 - Média e desvio padrão associado do número de ribotipos de cada área para os 5 momentos de amostragem. O sinal (-) indica ausência de amostras.

		Área A	Área C	Área E
Dia 3	Média	30,0	27,0	35,3
	Desvio Padrão	6,93	8,08	2,75
Dia 7	Média	31,8	34,5	35,0
	Desvio Padrão	2,87	2,38	2,31
Dia 15	Média	20,0	35,5	31,5
	Desvio Padrão	2,45	4,20	2,38
Dia 30	Média	28,5	41,5	34,0
	Desvio Padrão	2,38	3,70	4,40
Dia 60	Média	33,0	44,3	-
	Desvio Padrão	2,94	4,50	-

Relativamente à área E, a riqueza em ribotipos das amostras foi muito semelhante entre todos os dias de amostragem, não havendo diferenças significativas entre nenhum dos momentos de amostragem (tabela 7).

5. Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho relativamente à abundância relativa dos ribotipos mostram que existem diferenças entre as comunidades bacterianas que colonizaram as folhas em decomposição nas três áreas de amostragem em todos os momentos de amostragem, com exceção do 15º dia. A existência destas diferenças, talvez se devam ao facto de as três áreas de amostragem estarem dispostas ao longo de um gradiente de salinidade, em que a área A corresponde a um ambiente típico marinho, a área C a um ambiente de salinidade intermédia e a área E a um ambiente típico de água doce (Quintino *et al.*, 2009). Estudos anteriores comprovam que as comunidades microbianas de ambientes marinhos diferem das comunidades microbianas de ambientes de água doce (Bernhard *et al.*, 2005). A exceção parece ser o 15º dia, uma vez que

apenas nesse dia as comunidades presentes não são significativamente diferentes nas três áreas, o que poderá ser explicado pelo facto de nesse dia de amostragem a maré estar muito alta os sacos encontraram-se enterrados.

Relativamente à análise da riqueza em ribotipos em cada momento de amostragem para as três áreas, observa-se que apenas no 3º dia existem diferenças significativas entre as três áreas (área A- média de 14,3 ribotipos, área C- média de 17,8 ribotipos e área E- média de 22,9 ribotipos). O facto de existirem diferenças entre as três áreas no dia 3, pode dever-se ao facto de se tratar da fase inicial de colonização microbiana, instalação dos fungos e das bactérias específicas (capazes de degradar os complexos de celulose) (Das *et al.*, 2007), que como ocorre em áreas que possuem diferentes valores de salinidade (Quintino *et al.*, 2009) implica diferente diversidade bacteriana (Langenheder, 2005). Wu *et al.* (2006), sugerem que a salinidade afecta a composição da comunidade bacterioplanctónica, e Lozupone e Knight (2007) sugerem que a salinidade afecta também as comunidades bacterianas presentes no sedimento. Também estudos realizados na Ria de Aveiro (Henriques *et al.*, 2006), indicam que a salinidade e a temperatura são factores que afectam significativamente a composição das comunidades bacterioplanctónicas. É também importante referir que no 3º dia de amostragem a área que apresenta maior número de ribotipos é a E (ambiente de água doce), talvez por a *Phragmites australis* ser uma planta típica de água doce e as bactérias deste ambiente estejam melhor adaptadas para iniciar a colonização deste substrato.

Para o dia 60, verifica-se que as áreas C e E são estatisticamente diferentes relativamente à riqueza em ribotipos, sendo que a área C apresenta o maior número de ribotipos das três áreas amostradas (média de 32,4 ribotipos). Como a área C é um ambiente com valores de salinidade intermédios (Quintino *et al.*, 2009), sujeito a massas de água de elevada salinidade provenientes de jusante e sujeito a massas de água com uma salinidade muito reduzida proveniente de montante, talvez algumas comunidades bacterianas das áreas A e E estejam também presentes na área C.

A análise das amostras da área A ao longo dos 5 momentos de amostragem relativamente à riqueza em ribotipos, mostra que à excepção do dia 15 (dia ignorado devido a problemas na amostragem) não existem diferenças significativas entre nenhum momento. No ambiente marinho a riqueza bacteriana não foi significativamente diferente ao longo dos 60 dias.

Tal como na área A, também na área E não se observam diferenças significativas na riqueza em ribotipos entre os 4 momentos de amostragem. Contudo, estudos realizados em folhas em decomposição submersas em ecossistemas de água doce, indicam que o número de ribotipos da comunidade bacteriana associada às folhas em decomposição aumenta progressivamente, decrescendo apenas nos últimos estádios de decomposição (taxas de decomposição elevadas) (Das *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2009). Análises moleculares mais aprofundadas, nomeadamente a detecção e identificação dos membros mais activos da comunidade decompositora, poderão permitir o esclarecimento da variação da composição das comunidades bacterianas durante a degradação das folhas, nesta área.

Ao contrário das áreas A e E, localizadas nas extremidades do estuário, na área C verifica-se que não existem diferenças significativas no que respeita à riqueza em ribotipos entre os momentos de amostragem mais próximos, isto é, o dia 3 e 7, o dia 7 e 15, o dia 15 e 30 e o dia 30 e 60, indicando que as alterações que ocorrem na estrutura da comunidade bacteriana ao longo do tempo são graduais. Observa-se também, nesta área um aumento gradual no número médio de ribotipos ao longo de toda a amostragem (média de 27; 34.5; 35.5; 41.5 e 44.3 ribotipos), que se pode dever ao facto de após a colonização microbiana decompositora específica inicial, capaz de degradar os polímeros estruturais (lignocelulose), haver libertação de compostos como o nitrogénio, o carbono e os fosfatos (Gessner *et al.*, 1999), ocorrendo um rápido crescimento de bactérias heterotróficas (Anesio *et al.*, 2003). Associada a isto, também o desaparecimento de alguns ribotipos de fungos e a morte de outros pode proporcionar espaço e compostos orgânicos vantajosos para a colonização de mais bactérias (Das, 2006; Das *et al.*, 2007).

Como todos os métodos, também o DGGE tem uma serie de limitações que já foram referidas anteriormente. Neste trabalho as limitações encontradas foram:

- Não ser possível a análise entre géis, o que obriga a haver um estudo prévio da disposição das amostras em cada gel e da quantidade de géis necessários para se obter todas as respostas pretendidas.
- Não ser possível analisar conjuntamente uma quantidade relativamente grande de amostras, porque cada gel pode ter no máximo 24 amostras.
- Ser muito difícil a obtenção de um gel perfeito, isto porque existem muitos factores associados à corrida e à coloração (por exemplo, a quantidade de amostra, os tempos durante a coloração, a qualidade dos reagentes e até mesmo o operador).
- Como a quantidade de amostra aplicada no DGGE dependem da intensidade de amplificação do produto de PCR na electroforese, não é possível obter-se valores absolutos de abundância, pelo que não se pode fazer comparações entre as amostras.
- A análise dos géis no programa GelCompar ser subjectiva e requerer experiência de análise prévia.

Apesar das limitações encontradas, o DGGE é ainda assim o melhor método para uma análise rápida da diversidade bacteriana de comunidades complexas (Edenborn e Sexstone, 2007).

6. Sugestões para estudos futuros

A utilização de métodos moleculares para análise da diversidade bacteriana em estudos sobre a decomposição foliar é muito recente. Existe pois um longo caminho a percorrer até compreendermos as mudanças que ocorrem na

diversidade das comunidades bacterianas e fúngicas, o porquê delas mudarem e o que afecta a sua mudança.

Em estudos futuros acerca da comunidade microbiana na decomposição foliar em ecossistemas de transição, seria interessante que fossem recolhidos parâmetros como o pH, temperatura, nutrientes e actividade enzimática, para tentar perceber o que influencia a estrutura das comunidades ao longo do tempo para além do factor salinidade.

A sequenciação de alguns ribotipos que desaparecem/aparecem, ou perdem/ganham intensidade nos géis é também importante para se tentar caracterizar os tipos de bactérias mais dominantes nas diferentes áreas e nos diferentes dias.

O estudo da comunidade fúngica será também importante para compreender os padrões de sucessões microbianas.

A utilização de um controlo, isto é analisar também a comunidade bacteriana da água das diferentes áreas de amostragem, para percebermos até que ponto a comunidade que se instala nas folhas em decomposição se assemelha à do meio envolvente.

Como está já referenciado, sabe-se que a fase da colonização microbiana é muito importante na decomposição da folha e colonização dos macroinvertebrados (Graça, 2001), razão pela qual se poderia também estudar a diversidade da comunidade microbiana em todos os dias iniciais de submersão da folha (por exemplo desde o 1º até ao 10º dia) para se perceber as mudanças que ocorrem.

7. Bibliografia

- Abelho, M. 2008. "Effects of Leaf Litter Species on Macroinvertebrate Colonization during Decomposition in a Portuguese Stream." *Internat. Rev. Hydrobiol.* 93 (3): 358-371.
- Aboim, M. C. R., Barbosa, J. C., Coutinho, H. L. d. C. and Rosado, A. S. 2004. Avaliação da Diversidade Microbiana em Amostras de Solos: Técnica do PCR/DGGE (Protocolo Laboratorial). Rio de Janeiro, Embrapa solos: 31.
- Abrantes, A., Pinto, F. and Moreira, M. H. 1999. "Ecology of the polychaete *Nereis diversicolor* in the Canal de Mira (Ria de Aveiro, Portugal): Population dynamics, production and oogenic cycle." *Acta Oecologica* 20 (4): 267-283.
- Abreu, Â. A. V. 2004. Identificação de Bactérias Filamentosas em Processos de Lamas Activadas através da Técnica de Hibridização *in-situ* de Fluorescência (FISH). Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho. Mestrado em Tecnologias do Ambiente: 142.
- Ágoston-Szabó, E., Dinka, M., Némédi, L. and Horváth, G. 2006. "Decomposition of *Phragmites australis* rhizome in a shallow lake." *Aquatic Botany* 85 309-316.
- Alba-Tercedor, J. 1996. Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los ríos. IV Simposio del Agua en Andalucía (SIAGA). Almería: 203-213.
- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. 1995. "Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation." *Microbiological Reviews* 59: 143-169.
- Anderson, M. J. 2001. "A new method for non-parametric multivariate analysis of variance." *Austral Ecology* 26: 32-46.
- Anderson, M. J., Gorley, R. N. and Clarke, K. R. 2008. PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods. PRIMER-E. Plymouth, UK: 214.
- Anesio, A. M., Abreu, P. C. and Biddanda, B. A. 2003. "The role of free and attached microorganisms in the decomposition of estuarine macrophyte detritus." *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 56: 197-201.
- Bernhard, A. E., Colbert, D., McManus, J. and Field, K. G. 2005. "Microbial community dynamics based on 16S rRNA gene profiles in a Pacific Northwest estuary and its tributaries." *FEMS Microbiology Ecology* 52: 115-128.

- Boivin-Jahns, V., Bianchi, A., Ruimy, R., Garcin, J., Daumas, S. and Christen, R. 1995. "Comparison of Phenotypical and Molecular Methods for the Identification of Bacterial Strains Isolated from a Deep Subsurface Environment." *Applied and Environmental Microbiology* 61 (9): 3400-3406.
- Braioni, M. G., Gumiero, B. and Salmoiraghi, G. 2001. "Leaf Bags and Natural Leaf Packs: Two Approaches to Evaluate River Functional Characteristics." *Internat. Rev. Hydrobiol.* 86: 439-451.
- Camargo, I. 2009. *Classificação dos microrganismos*. São Paulo, Universidade de São Paulo. Instituto de Física de São Carlos: 45.
- Canhoto, C. and Graça, M. A. S. 1996. "Decomposition of *Eucalyptus globulus* leaves and three native leaf species (*Alnus glutinosa*, *Castanea sativa* and *Quercus faginea*) in a Portuguese low order stream." *Hydrobiologia* 333 (2): 79-85.
- Carrapa, A., Zão, A., Coelho, J., Santos, J. and Pedrosa, S. 2005. *Técnicas de análise de DNA aplicadas a diagnóstico*. Departamento de Biologia Celular e Molecular. Porto, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto: 11.
- Castela, J., Ferreira, V. and Graça, M. A. S. 2008. "Evaluation of stream ecological integrity using litter decomposition and benthic invertebrates" *Environmental Pollution* 153: 440-449.
- Cerejo, M. and Dias, J. M. 2007. "Tidal transport and dispersal of marine toxic microalgae in a shallow, temperate coastal lagoon." *Marine Environmental Research* 63: 313-340.
- Clarke, K. R. and Warwick, R. M. 2001. *Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation*. PRIMER-E. Plymouth, UK: 172.
- Das, M. 2006. *Microbial Community Structure and Interactions in Leaf Litter in a Stream*. Ohio, Kent State University. Douturamento em Filosofia: 174.
- Das, S., Lyla, P. S. and Khan, S. A. 2006. "Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives." *Current Science* 90: 1325-1335.
- Das, M., Royer, T. V. and Leff, L. G. 2007. "Diversity of Fungi, Bacteria and Actinomycetes on Leaves Decomposing in a Stream." *Applied and Environmental Microbiology* 73, No 3: 756-767.

- Dias, J. M., Lopes, J. E. and Dekeyser, I. 2001. "Lagrangian Transport of Particles in Ria de Aveiro Lagoon, Portugal." *Phys. Chem. Earth* 26 (9): 721-721.
- Duarte, S. A. F. 2008. Biodiversity and activity of microbial decomposers of leaf litter in streams under anthropogenic stress. Escola de Ciências, Universidade do Minho. Ph. D. Thesis in Sciences: 176.
- Duarte, S., Pascoal, C., Alves, A., Correia, A. and Cássio, F. 2009. "Assessing the dynamic of microbial communities during leaf decomposition in a low-order stream by microscopic and molecular techniques." *Microbiological Research*.
- Edenborn, S. L. and Sexstone, A. J. 2007. "DGGE fingerprinting of culturable soil bacterial communities complements culture-independent analyses " *Soil Biology & Biochemistry* 39: 1570-1579.
- Ercolini, D. 2004. "PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food." *Journal of Microbiological Methods* 56: 297- 314.
- Ferris, M. J., Muyzer, G. and Ward, D. M. 1996. "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles of 16S rRNA-Defined Populations Inhabiting a Hot Spring Microbial Mat Community." *Applied and Environmental Microbiology* 62: 340-346.
- Fleituch, T. and Leichtfried, M. 2004. "Ash Tree Leaf Litter (*Fraxinus excelsior* L.) Breakdown in Two Different Biotopes and Streams." *Internat. Rev. Hydrobiol.* 89: 508-518.
- Gessner, M. O., Chavet, E. and Dobson, M. 1999. "A perspective on leaf litter breakdown in streams." *Oikos* 85: 377-383.
- Gessner, M. O. 2000. "Breakdown and nutrient dynamics of submerged *Phragmites* shoots in the littoral zone of a temperate hardwater lake." *Aquatic Botany* 66: 9-20.
- Gessner, M. O. 2001. "Mass loss, fungal colonisation and nutrient dynamics of *Phragmites australis* leaves during senescence and early aerial decay." *Aquatic Botany* 69: 325-339.
- Gonçalves, J. F., França, J. S., Medeiros, A. O., Rosa, C. A. and Callisto, M. 2006. "Leaf Breakdown in a Tropical Stream." *Internat. Rev. Hydrobiol.* 91: 164-177.
- Gong, M. L., Ren, N. Q. and Xing, D. F. 2004. "Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis in microbial molecular ecology." *Wei Sheng Wu Xue Bao* 44(6): 845-848.

- Goulart, M. D. C. and Callisto, M. 2003. "Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental." *Revista da FAPAM* 1: 9.
- Gouveia, M. E. M. 2004. Métodos Moleculares de Identificação, Caracterização e Detecção de *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman e *Phytophthora cinnamomi* Rands Associadas com a Doença da Tinta do Castanheiro. Vila Real, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Douturamento em Ciências Agronómicas: 164.
- Graça, M. A. S. 2001. "The Role of Invertebrates on Leaf Litter Decomposition in Streams – a Review." *Internat. Rev. Hydrobiol.* 86: 383-393.
- Henriques, I. S., Alves, A., Tacão, M., Almeida, A., Cunha, Â. and Correia, A. 2006. "Seasonal and spatial variability of free-living bacterial community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal)." *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 68: 139-148.
- Jackson, C. R., Roden, E. E. and Churchill, P. F. 2000. "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Can Fail to Separate 16S rDNA Fragments with Multiple Base Differences." *Molecular Biology Today* 1(2): 49-51.
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H. and Trevors, J. T. 2004. "Methods of studying soil microbial diversity." *Journal of Microbiological Methods* 58: 169- 188.
- Klug, W. S. and Cummings, M. R. 1999. *Essentials of Genetics*. New Jersey, Macmillan Publishing Company.
- Komínková, D., Kuehn, K. A., Büsing, N., Steiner, D. and Gessner, M. O. 2000. "Microbial biomass, growth, and respiration associated with submerged litter of *Phragmites australis* decomposing in a littoral reed stand of a large lake." *Aquatic Microbial Ecology* 22: 271-282.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L. and Pace, N. R. 1985. "Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 6955-6959.
- Langenheder, S. 2005. *Links between Structure and Function of Heterotrophic Aquatic Bacterial communities*. Acta Universitatis Upsaliensis. Uppsala, Faculty of Science and Technology 18. PhD: 64.
- Lopes, J. F. and Dias, J. M. 2007. "Residual circulation and sediment distribution in the Ria de Aveiro lagoon, Portugal." *Journal of Marine Systems* 68: 507-528.

- Lozupone, C. A. and Knight, R. 2007. "Global patterns in bacterial diversity." PNAS 104 (27): 11436-11440
- Menéndez, M., Martínez, M., Hernández, O. and Comin, F. A. 2001. "Comparison of Leaf Decomposition in Two Mediterranean Rivers: a Large Eutrophic River and an Oligotrophic Stream (S Catalonia, NE Spain)." Internat. Rev. Hydrobiol. 86: 475-486.
- Mille-Lindblom, C. and Tranvik, L. J. 2003. "Antagonism between Bacteria and Fungi on Decomposing Aquatic Plant Litter." Microbial Ecology 45: 173-182.
- Moreira, M. H., Queiroga, H., Machado, M. M. and Cunha, M. R. 1993. "Environmental gradients in a southern europe estuarine system: Ria de Aveiro, Portugal Implications for soft bottom macrofauna colonization." Netherlands Journal of Aquatic Ecology 27(2-4): 465-482.
- Moretti, M. d. S. 2005. Decomposição de detritos foliares e sua colonização por invertebrados aquáticos em dois córregos na Cadeia do Espinhaço (MG). Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. Mestrado em Ecologia: 63.
- Muyzer, G., Waal, E. C. D. and Uittierlinden, A. G. 1993. "Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA." Applied and Environmental Microbiology 59: 695-700.
- Muyzer, G. and Smalla, K. 1998. "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology." Kluwer Academic Publishers 73: 127-141.
- Muyzer, G. 1999. "DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems." Current Opinion in Microbiology 2: 317-322.
- Nakatsu, C. H., Torsvik, V. and Øvreås, L. 2000. "Soil Community Analysis Using DGGE of 16S rDNA Polymerase Chain Reaction Products." Soil Science Society of America Journal 64: 1382-1388.
- Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwig, W. and Backhaus, H. 1996. "Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis." J. Bacteriol. 178: 5636-5643.
- Peixoto, M. J. B. M. M. 2008. Qualidade Biológica da Água do Rio Cávado. Faculdade de Ciências. Porto, Universidade do Porto. Mestrado em Hidrologia: 124.

- Petersen, R. C. and Cummins, K. W. 1974. "Leaf processing in a woodland stream." *Freshwater Biol.* 4: 343-368.
- Quintino, V., Sangiorgio, F., Ricardo, F., Mamede, R., Pires, A., Freitas, R., Rodrigues, A. M. and Basset, A. 2009. "*In situ* experimental study of reed leaf decomposition along a full salinity gradient." *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 85: 497-506.
- Rodrigues, M., Oliveira, A., Queiroga, H., Fortunato, A. B. and Zhang, Y. J. 2009. "Three-dimensional modeling of the lower trophic levels in the Ria de Aveiro (Portugal)." *Ecological Modelling* 220: 1274-1290.
- Sabetta, L., Costantini, M. L., Maggi, O., Persiani, A. M. and Rossi, L. 2000. "Interactions between detritivores and microfungi during the leaf detritus decomposition in a volcanic lake (Lake Vico - central Italy)." *Hydrobiologia* 439: 49-60.
- Sampaio, A., Cortes, R. and Leão, C. 2004. "Yeast and Macroinvertebrate Communities Associated with Leaf Litter Decomposition in a Second Order Stream." *Internat. Rev. Hydrobiol.* 89: 453-466.
- Sangiorgio, F., Basset, A., Pinna, M., Sabetta, L., Abbiati, M., Ponti, M., Minocci, M., Orfanidis, S., Nicolaidou, A., Moncheva, S., Trayanova, A., Georgescu, L., Dragan, S., Beqiraj, S., Koutsoubas, D., Evagelopoulos, A. and Reizopoulou, S. 2007. "Ecosystem processes: litter breakdown patterns in Mediterranean and Black Sea transitional waters." *Transit. Waters Bull.* 3: 51-55.
- Sangiorgio, F., Pinna, M. and Basset, A. s.d. The litter bag technique for studying detritus decomposition in aquatic ecosystems. A case study in the South of Italy (Lake Alimini). Department of Biological and Environmental Sciences and Technologies. Italy, University of Salento: 118-129.
- Sharma, R., Singh, M. and Sharma, A. 2002. "Polymerase Chain Reaction: an Emerging Tool for Research in Pharmacology." *Indian Journal of Pharmacology* 34: 229-236.
- Suberkropp, K. 2001. "Fungal Growth, Production, and Sporulation during Leaf Decomposition in Two Streams." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (11): 6063-5068.
- Tagliaferro, A. C. 2005. Análise Molecular da Diversidade Bacteriana de Solos do Cerrado Utilizando Bibliotecas de rDNA 16S - Uma perspectiva Biotecnológica. Brasília, Universidade Católica de Brasília. Mestrado de Ciências Genômicas e Biotecnologia: 125.

- Thomaz, S. M. 1999. O Papel Ecológico das Bactérias e Teias Alimentares Microbianas em Ecossistemas Aquáticos. Maringá, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia – Nupelia: 18.
- Torsvik, V., Goksoyr, J. and Daae, F. L. 1990. "High Diversity in DNA of Soil Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 56: 782-787.
- Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R.-A. and Øvreas, L. 1998. "Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments." *Journal of Biotechnology* 64: 53-62.
- Vaz, N., Dias, J. M., Leitão, P. C. and Nolasco, R. 2007. "Application of the Mohid-2D model to a mesotidal temperate coastal lagoon." *Computers & Geosciences* 33: 1204-1209.
- Videira, A. 2001. *Engenharia Genética, Principios e Aplicações*. Lisboa, Lidel - Edições Técnicas, Lda.
- Webster, J. R. and Benfield, E. F. 1986. "Vascular Plant Breakdown in Freshwater Ecosystems." *Annual Review of Ecology and Systematics* 17: 567-594.
- Webster, J. R., Benfield, E. F., Hutchens, J. J., Tank, J. L., Golladay, S. W. and Adam, J. C. 2001. "Do Leaf Breakdown Rates Actually Measure Leaf Disappearance from Streams?" *Internat. Rev. Hydrobiol.* 86.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. 1991. "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study." *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M. and Woolverton, C. J. 2008. *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology*. New York, McGraw - Hill Companies.
- Wu, Q. L., Zwart, G., Schauer, M., Agterveld, M. P. K.-v. and Hahn, M. W. (2006). "Bacterioplankton Community Composition along a Salinity Gradient of Sixteen High-Mountain Lakes Located on the Tibetan Plateau, China." *Applied and Environmental Microbiology* 72 (8): 5478-5485.

(Camargo, 2009)

(Rodrigues *et al.*, 2009)

(Lozupone e Knight, 2007)

Duarte, S., Pascoal, C., Alves, A., Correia, A. and Cássio, F. 2009. "Assessing the dynamic of microbial communities during leaf decomposition in a low-order stream by microscopic and molecular techniques." *Microbiological Research*.

(Weisburg *et al.*, 1991)

(Nubel *et al.*, 1996)