

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADA À
DECOMPOSIÇÃO DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS EM UMA MARISMA DA
LAGOA DOS PATOS (RS)**

Belize Rodrigues Leite
Bióloga (Biologia Marinha e Costeira, UFRGS).

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
Pré-requisito para obtenção do grau de mestre em Microbiologia agrícola e do ambiente.

Orientadora: Patricia Valente.

PORTO ALEGRE, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.
FEVEREIRO, 2014.

AGRADECIMENTOS

À professora Patricia Valente: pela orientação e por nos receber sempre tranquila, com um sorriso no rosto. Acredite, isso faz toda a diferença! Principalmente por me dar créditos e concordar em dar continuidade a essa parceria que vem desde a graduação. Aos colegas do laboratório de Micologia, principalmente à Danielle Pagani, Sandra Mendes e Mauricio Ramírez... Sem a ajuda de vocês certamente este trabalho não seria nem metade do que é! À Melissa Landell, por todos os saberes transmitidos e conselhos. Aos colegas do mestrado Andréa, Pri, Fernanda, Marcos, Ana, Karine, Thaisa e Valdir: vocês tornaram estes dois anos bem mais felizes e menos desgastantes!

Ao professor Paulo Abreu, pela ideia, pela parceria, por me acolher em seu laboratório, por ser sempre tão solícito e cordial comigo. Não é em qualquer lugar que chegamos e encontramos as portas abertas como encontrei no Laboratório de Microorganismos Marinhos da FURG. À Erica da Silveira, porque sem a ajuda dela para fixar o meu experimento certamente as minhas amostras estariam rumando para o outro lado do Atlântico há esta hora. À Mariana Rydz e à Luciana Medeiros, pela amizade e por me acolherem tão bem em suas casas em Rio Grande. Ao Baiano e ao Cae também. Seria muito menos legal sem vocês! Imensa gratidão por tudo.

Aos meus pais, por toda força e apoio: vocês são meu porto seguro, a minha base... Tudo que eu sei, o que eu me tornei... Devo a vocês. Creio que nem se vocês vivessem duzentos anos, eu conseguiria retribuir todo o bem que vocês me fazem. TODO O MEU AMOR a vocês! Às muitas pessoas maravilhosas que tenho em minha vida... Especialmente ao meu “treinador” Martin.

Aos queridos Willian, Suelen, Bruna e Raquel, do Laboratório de Solos da Faculdade de Agronomia, vocês me acolheram como se “eu fosse de casa”. Nunca vou me esquecer disto. Aos amigos e colegas do Circo Híbrido, do Maracatu Truvão e do grupo Andanças. Vocês preencheram os meus dias com arte, dança e riso... Fizeram essa jornada ser bem mais leve! Aposto que nem perceberam, mas foram o meu “combustível” nesses dois anos. Obrigada, obrigada, e mais obrigada!

"Cuidado, a vida é muito curta para ser pequena. É preciso engrandecê-la. E, para isso, é preciso tomar cuidado com duas coisas: a primeira é que tem muita gente que cuida demais do urgente e deixa de lado o importante. Cuida da carreira, do dinheiro, do patrimônio, mas deixa o importante de lado. Depois não dá tempo. (...) O essencial é tudo aquilo que não pode não ser: (...) integridade, liberdade, felicidade. Isso é essencial. Fundamental é tudo aquilo que te ajuda a chegar ao essencial. (...) Uma escada é algo que me ajuda a chegar a algum lugar. Ninguém tem uma escada para ficar nela. Dinheiro não é essencial (...), é fundamental. Essencial é aquilo que faz com que a vida não se apequene. Que faz com que a gente seja capaz de transbordar. Repartir vida. Repartir o essencial, a amizade, a amorosidade, a fraternidade, a lealdade. Repartir a capacidade de ter esperança e, para isso, ter coragem."

Mario Sérgio Cortella

AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADA À DECOMPOSIÇÃO DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS EM UMA MARISMA DA LAGOA DOS PATOS (RS)

Autora: Belize Rodrigues Leite. Orientadora: Patricia Valente.

RESUMO

Marismas são ecossistemas úmidos costeiros de alta produtividade oriunda da decomposição das macrófitas que cobrem estes ambientes. O presente estudo avaliou a diversidade e o potencial biotecnológico das leveduras associadas aos detritos de *Scirpus maritimus*, *Spartina alterniflora* e *Spartina densiflora* numa marisma da Lagoa dos Patos/RS. A decomposição foi analisada aos 7, 14, 40, 100 e 220 dias pelo método de “*litter bags*”. As contagens variaram entre 2,3 e 6,36 log UFC leveduras.g⁻¹ de detrito, observando-se um crescimento da comunidade até os 40 dias, com um posterior declínio até os 220 dias. *S. alterniflora* foi a macrófita melhor decomposta: o peso dos detritos reduziu-se em 62% ao final do estudo. As taxas de decomposição foram maiores na fase tardia (100 e 220 dias), mas não estiveram associadas a um aumento da quantidade ou diversidade de leveduras, embora algumas enzimas testadas tenham sido mais ativas neste período. Os 106 isolados de leveduras foram representados por 22 grupos distintos: *S. densiflora* apresentou a maior riqueza de espécies (n = 15), enquanto as outras macrófitas apresentaram 12 espécies cada uma. *Acremonium* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Bullera pseudoalba*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces ruberrimus* e *Yarrowia lipolytica* foram as principais espécies encontradas. Uma possível nova espécie de *Tremella* foi isolada. A composição específica variou conforme a macrófita e os tempos de decomposição. A atividade lipolítica foi verificada em todos os isolados. Os índices mais expressivos foram exibidos pelas lipases de *Basidiomycota* e celulasas de *A. pullulans*, principalmente aos 7 e 14 dias de decomposição.

ASSESSMENT OF THE YEAST COMMUNITY ASSOCIATED WITH THE DECOMPOSITION OF AQUATIC MACROPHYTES FROM SALTMARSHES OF PATOS LAGOON (RS)

Author: Belize Rodrigues Leite. Advisor: Patricia Valente.

ABSTRACT

Salt marshes are coastal wet ecosystems of high productivity originated from the decomposition of macrophytes covering these environments. The present study assessed the diversity and biotechnological potential of yeasts associated with debris of *Scirpus maritimus*, *Spartina alterniflora* and *Spartina densiflora* in a salt marsh of the Patos Lagoon/RS. The decomposition was analyzed at 7, 14, 40, 100 and 220 days through the method of litter bags. Counts ranged between 2.3 and 6.36 log CFU yeasts.g⁻¹ detritus, noticing a growing community until the 40th day, with a subsequent decline at the 220th day. *S. alterniflora* was the most decomposed macrophyte: the weight was reduced by 62% at the end of the study. The decomposition rates were higher in late stage (100 and 220 days), but they were not associated with an increased yeast counts or diversity, although some enzymes tested were more active during this period. The 106 yeast isolates were represented by 22 different groups: *S. densiflora* showed the highest species richness (n = 15), while the other macrophytes had 12 species each. *Acremonium* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Bullera pseudoalba*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces ruberrimus* and *Yarrowia lipolytica* were the main species found. A possible new species of *Tremella* was isolated. Species composition varied according to macrophyte and time of decomposition. The lipase activity was observed in all isolates. Most significant indexes were displayed by lipases from *Basidiomycota* and cellulases of *A. pullulans*, especially at 7 and 14 days of decomposition.

Master of Science dissertation in Environmental and Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (156 p.) February, 2014.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vi
RELAÇÃO DE TABELAS	viii
RELAÇÃO DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
3 HIPÓTESES	5
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
4.1 MARISMAS	6
4.2 DECOMPOSIÇÃO DAS MACRÓFITAS AQUÁTICAS	9
4.3 ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DECOMPOSIÇÃO VEGETAL	12
4.4 MICROBIOTA DECOMPOSITORA	17
4.5 MÉTODOS DE ESTUDO APLICADOS	19
4.5.1 Tipos de ensaio e caracterização do substrato	19
4.5.2 <i>Standing litter</i>	21
4.5.3 Isótopos estáveis	21
4.5.4 Métodos tradicionais	23
4.5.5 FISH	24
4.5.6 Biomassa	25
4.5.7 Métodos moleculares	26
4.6 CONHECIMENTO SOBRE MICRORGANISMOS COLONIZADORES DE PLANTAS AQUÁTICAS E DETRITOS	30
4.6.1 Bactérias	30
4.6.2 Fungos filamentosos	34
4.5.3 Leveduras	37
4.6.1 Interações entre os microrganismos decompositores	42
4.6 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS DECOMPOSITORES	45
5 MATERIAL E MÉTODOS	50
5.1 ÁREA DE ESTUDO	50
5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	53
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE E DO SUBSTRATO	56
5.4 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE DECOMPOSIÇÃO DAS MACRÓFITAS	57
5.5 CONTAGEM E ISOLAMENTO DE LEVEDURAS	57
5.6 CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS	58
5.7 TIPIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	59
5.8 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS	59
5.8.1 Extração de DNA	60
5.8.2 Sequenciamento da região D1/D2 do LSU rDNA e ITS	60
5.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS ISOLADOS	61
5.9.1 Degradação de tributirina	62
5.9.2 Degradação de esterases	63
5.9.3 Degradação de caseína	64
5.9.4 Degradação de gelatina	65
5.9.5 Degradação de amido	66
5.9.6 Degradação de CMC (carboximetilcelulose)	67
5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	68
6 RESULTADOS	69

6.1 CARACTERIZAÇÃO DO DETRITO DAS MACRÓFITAS AQUÁTICAS AO LONGO DO PROCESSO DE DECOMPOSIÇÃO	69
6.2 CONDICIONANTES AMBIENTAIS	70
6.3 COMUNIDADE DE LEVEDURAS DAS MACRÓFITAS AQUÁTICAS: PLANTA VIVA <i>VERSUS</i> DETRITO EM DECOMPOSIÇÃO	73
6.4 CARGA DE LEVEDURAS E FUNGOS LEVEDURIFORMES POR ESPÉCIE DE MACRÓFITA AQUÁTICA E POR PERÍODO DE DECOMPOSIÇÃO	75
6.5 ISOLAMENTO E DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DE LEVEDURAS E FUNGOS LEVEDURIFORMES COLONIZADORES DO DETRITO DAS MACRÓFITAS AQUÁTICAS	80
6.6 DIVERSIDADE DE LEVEDURAS E FUNGOS LEVEDURIFORMES COLONIZADORES DO DETRITO DAS MACRÓFITAS AQUÁTICAS	84
6.7 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS LEVEDURAS E DOS FUNGOS LEVEDURIFORMES COLONIZADORES DO DETRITO DAS MACRÓFITAS AQUÁTICAS	99
7 DISCUSSÃO	117
7.1 DECOMPOSIÇÃO <i>VERSUS</i> DIVERSIDADE ASSOCIADA	117
7.2 DECOMPOSIÇÃO <i>VERSUS</i> PERFIL ENZIMÁTICO	120
7.2 DIVERSIDADE <i>VERSUS</i> POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	122
8 CONCLUSÕES	132
9 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	134

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1	Compilação de alguns estudos já realizados com enfoque na colonização bacteriana de algas e macrófitas	30
Tabela 2	Compilação de alguns estudos já realizados com enfoque na colonização fúngica de macrófitas	35
Tabela 3	Variação das condicionantes ambientais durante o período analisado. Os valores para precipitação representam o total mensal acumulado e os demais valores (temperatura do ar, temperatura da água e salinidade) representam as médias mensais correspondentes às datas de coleta dos <i>litter bags</i> .	70
Tabela 4	Correlação de Pearson entre a carga de leveduras e fungos leveduriformes (UFC.g ⁻¹ de detrito) isolados das espécies <i>Scirpus maritimus</i> , <i>Spartina alterniflora</i> e <i>Spartina densiflora</i> e as variáveis tempo de decomposição; perda de massa do detrito (percentual em relação ao peso inicial do detrito); [N]: concentração de nitrogênio do detrito (percentual de N.g ⁻¹ de detrito); T _{ar} : temperatura do ar (°C); T _{água} : temperatura da água (°C); salinidade da água (%); precipitação (mm mensais). Consideraram-se: correlações fracas < 0,5 e correlações fortes ≥ 0,5 (realçados em negrito).	78
Tabela 5	Subgrupos de <i>Basidiomycota</i> e sua respectiva morfologia colonial característica.	84
Tabela 6	Diversidade, representatividade e tipo de detrito colonizado pelos subgrupos de <i>Basidiomycota</i> .	85
Tabela 7	Subgrupos de <i>Ascomycota</i> e sua respectiva morfologia colonial característica.	87
Tabela 8	Diversidade, representatividade e tipo de detrito colonizado pelos subgrupos de <i>Ascomycota</i> .	87
Tabela 9	Subgrupos dos fungos leveduriformes negros e sua respectiva morfologia colonial característica.	89
Tabela 10	Diversidade, representatividade e tipo de detrito colonizado pelos subgrupos de fungos leveduriformes negros.	89
Tabela 11	Subgrupos dos fungos leveduriformes brancos e sua respectiva morfologia colonial característica.	90
Tabela 12	Diversidade, representatividade e tipo de detrito colonizado pelos subgrupos de fungos leveduriformes brancos.	90
Tabela 13	ANOVA bifatorial sobre a variável índice enzimático médio (IE) de cada espécie de macrófita (tratamento) e tempo de decomposição. NS: não significativo.	106
Tabela 14	Isolados com maior atividade enzimática (menores valores médios de IE) para cada substrato testado.	113

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1	Localização da Lagoa dos Patos e zona estuarina, com destaque para a Ilha da Pólvora, área do presente estudo. Fonte: CUNHA e colaboradores (2005).	50
Figura 2	Manchas de marismas da Ilha da Pólvora	51
Figura 3	Macrófitas escolhidas para realização do ensaio de “ <i>litter bags</i> ”. A. <i>Spartina alterniflora</i> . B. <i>Spartina densiflora</i> . C. <i>Scirpus maritimus</i> . Fontes: Wikipedia.	54
Figura 4	Imagem aérea da Ilha da Pólvora com a localização do ponto de coleta das amostras de macrófitas aquáticas (círculo). Fonte: http://mikrus.com.br .	54
Figura 5	Localização dos bancos de macrófitas, pontos nos quais foram depositados os “ <i>litter bags</i> ” de <i>Scirpus maritimus</i> (1), <i>Spartina alterniflora</i> (2) e <i>Spartina densiflora</i> (3).	55
Figura 6	Demonstração da disposição dos “ <i>litter bags</i> ” contendo os detritos das macrófitas aquáticas a serem coletados em tempos determinados. Fonte: http://ecoplexity.org .	56
Figura 7	Tubos contendo o meio teste da urease. Os tubos com coloração mais clara, à esquerda, representam os resultados positivos para a degradação da ureia do meio. Os tubos com coloração rosa intenso, à direita, representam os resultados negativos.	58
Figura 8	Cor da reação positiva ao corante DBB. As colônias eram originalmente brancas.	59
Figura 9	Cultivo de leveduras por picada em meio contendo tributirina. Observa-se um halo translúcido de degradação do substrato ao redor dos cinco isolados, resultado positivo para produção de lipases.	63
Figura 10	Cultivo de leveduras por picada em meio contendo Tween 80. Observa-se o halo de precipitação do carbonato de cálcio ao redor de três dos quatro isolados, resultado positivo para produção de esterases. O isolado localizado no quadrante superior da direita (colônia branca) não produziu a enzima.	64
Figura 11	Cultivo de leveduras por picada em meio contendo caseína. Observa-se um halo esbranquiçado de degradação do substrato ao redor dos dois isolados na porção superior da placa, resultado positivo para produção de caseinase.	65
Figura 12	Cultivo de leveduras por picada em meio contendo gelatina. Observa-se um halo esbranquiçado de degradação do substrato ao redor de dois dos cinco isolados presentes na placa, resultado positivo para produção de gelatinase.	66
Figura 13	Cultivo de leveduras por picada em meio contendo amido. Observa-se um halo alaranjado de degradação do substrato ao redor de um dos três isolados presentes na placa, resultado positivo para produção de amilase.	67
Figura 14	Cultivo de leveduras por picada em meio contendo	68

	carboximetilcelulose. Observa-se um halo alaranjado de degradação do substrato ao redor de dois dos três isolados presentes na placa (situados na porção superior), resultado positivo para produção de celulases.	
Figura 15	Variação da perda de massa do detrito em decomposição das espécies <i>Scirpus maritimus</i> , <i>Spartina alterniflora</i> e <i>Spartina densiflora</i> .	71
Figura 16	Variação da carga de nitrogênio do detrito em decomposição das espécies <i>Scirpus maritimus</i> , <i>Spartina alterniflora</i> e <i>Spartina densiflora</i> .	73
Figura 17	Cultivos de leveduras e fungos leveduriformes, com concentrações iguais, isolados de plantas vivas (à esquerda das fotos) e do detrito em decomposição da respectiva espécie (à direita das fotos). Os tempos de decomposição estão representados pelas linhas: tempo 7 dias na primeira linha (figuras A , B e C), tempo 14 dias na segunda linha (figuras D , E e F) e tempo 40 dias na terceira linha (figuras G , H e I). As espécies das macrófitas aquáticas estão representadas pelas colunas: <i>Scirpus maritimus</i> na primeira coluna (figuras A , D e G), <i>Spartina alterniflora</i> na segunda coluna (figuras B , E e H) e <i>Spartina densiflora</i> na terceira coluna (figuras C , F e I).	74
Figura 18	Variação da carga de leveduras e fungos leveduriformes do detrito em decomposição das espécies <i>Scirpus maritimus</i> , <i>Spartina alterniflora</i> e <i>Spartina densiflora</i> .	76
Figura 19	“Scatterplot” dos “litter bags” de acordo com a perda de massa percentual, a carga de N percentual por mm ⁻¹ de folha e a carga total de leveduras (log UFC por grama de folha). Cada “litter bag” foi recebida a sigla LB acompanhada de um número correspondente à espécie e ao tempo de decomposição (de 1 a 15).	79
Figura 20	Representatividade dos grupos fúngicos isolados.	80
Figura 21	Representatividade dos grupos fúngicos isolados do detrito de cada espécie de macrófita.	81
Figura 22	Composição percentual dos grupos fúngicos isolados do detrito de cada espécie de macrófita (<i>Scirpus maritimus</i> , <i>Spartina alterniflora</i> e <i>Spartina densiflora</i>) em diferentes tempos de decomposição (7, 14, 40, 100 e 220 dias). “Fungos lev.”: fungos leveduriformes.	83
Figura 23	Morfologia colonial de alguns dos representantes de <i>Basidiomycota</i> .	86
Figura 24	Morfologia colonial de alguns dos representantes de <i>Ascomycota</i> .	88
Figura 25	Morfologia colonial dos representantes dos fungos leveduriformes negros. <i>Aureobasidium pullulans</i> à esquerda e Grupo 26 à direita.	89
Figura 26	Morfologia colonial dos representantes dos fungos leveduriformes brancos.	90

Figura 27	Variação temporal da composição percentual específica da comunidade de leveduras associada a <i>Scirpus maritimus</i> .	93
Figura 28	Variação temporal da composição percentual específica da comunidade de leveduras associada a <i>Spartina alterniflora</i> .	95
Figura 29	Variação temporal da composição percentual específica da comunidade de leveduras associada a <i>Spartina densiflora</i> .	96
Figura 30	Índice de Shannon-Wiener (H) do conjunto de espécies amostrado em cada "litter bag".	97
Figura 31	Curva de rarefação das espécies de leveduras encontradas nas amostras coletadas ("litter bags"). Os números representam as 15 unidades de esforço amostral ("litter bags") coletadas ao longo do tempo.	98
Figura 32	Quantidade de isolados de cada grupo morfológico hábil a degradar os substratos testados.	100
Figura 33	Percentual de degradadores negativos e positivos de cada grupo morfológico. Fungos lev.: fungos leveduriformes.	101
Figura 34	Quantidade de isolados de cada espécie de macrófita capazes de degradar os substratos testados.	102
Figura 35	Percentual de leveduras e fungos leveduriformes degradadores negativos e positivos isolados de cada espécie de macrófita aquática.	103
Figura 36	Índices enzimáticos médios (IE médios) das leveduras isoladas de diferentes macrófitas e tempos de decomposição. Quanto menor o valor de IE, maior o tamanho do halo com relação ao tamanho da colônia da levedura, e, portanto, maior a atividade enzimática.	104
Figura 37	Perfil de degradação de <i>Basidiomycota</i> ao longo da decomposição do detrito das três espécies de macrófitas estudadas.	108
Figura 38	Perfil de degradação de <i>Ascomycota</i> ao longo da decomposição do detrito das três espécies de macrófitas estudadas.	109
Figura 39	Perfil de degradação dos fungos leveduriformes negros ao longo da decomposição do detrito das três espécies de macrófitas estudadas.	110
Figura 40	Perfil de degradação dos fungos leveduriformes brancos ao longo da decomposição do detrito das três espécies de macrófitas estudadas	111
Figura 41	Isolado DEC 39 (<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>) exibindo halo de produção da caseinase (colônia abaixo, à esquerda).	114
Figura 42	Isolado DEC 72 (<i>Yarrowia lipolytica</i>) exibindo halo de produção da gelatinase.	115
Figura 43	Isolado Dec 27 exibindo halo de produção da amilase.	113
Figura 44	Isolado DEC 102 (<i>Acremonium</i> sp.) exibindo halo de produção da celulase.	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ARISA: “*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*” (análise automatizada de espaçadores ribossomais intergênicas)

°C: graus Celsius

DGGE: “*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*” (eletroforese em gradiente de gel desnaturante)

dATP: Deoxi-adenina trifosfato

dCTP: Deoxi-citosina trifosfato

dGTP: Deoxi-guanina trifosfato

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: desoxiribonucleotídeos

dTTP: Deoxi-timina trifosfato

EDTA: “*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*” (ácido tetra acético etilenodiamina)

FISH: “*Fluorescence In situ Hybridization*” (hibridização fluorescente in situ)

g: gramas

ha: hectare

ITS: “*Internal Transcribed Spacer*” (espaçador interno transcrito do ribossomo)

L: litro

LSU: “*Large Subunit*” (subunidade maior do ribossomo)

µL: microlitro

M: molar

min: minutos

mL: mililitro

mM: micromolar

ng: nanogramas

PCR: reação em cadeia da polimerase

rDNA: DNA ribossomal

RFLP: “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” (comprimento do polimorfismo do fragmento de restrição)

RNA: ácido ribonucleico

RPM: rotações por minuto

s: segundos

SSU: “*Small Subunit*” (subunidade menor do ribossomo)

Taq: *Thermus aquaticus*

TE: tampão Tris-EDTA.

TGGE: “Temperature Gradient Gel Electrophoresis” (eletroforese em gradiente de temperatura desnaturante)

TRFLP: “*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*” (comprimento do polimorfismo do fragmento terminal de restrição)

U: Unidade internacional (quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 micromol de produto por minuto)

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

1 INTRODUÇÃO

O número de espécies de fungos na Terra está estimado em 6 milhões (TAYLOR et al., 2013). Pressupõe-se que menos de 10% do total da diversidade deste grupo vem sendo descrita (HAWKSWORTH, 2001). Os fungos são colonizadores bem sucedidos de uma ampla gama de ambientes. Pertencem ao domínio Eukarya, apresentam parede celular rígida e ausência de clorofila, nutrem-se por absorção dos nutrientes do meio e reproduzem-se sexuadamente por intermédio de células especializadas nomeadas esporos. Os esporos podem ser facilmente transportados por correntes de água ou ar, sendo considerados ubíquos na atmosfera terrestre.

Os grupos *Ascomycota* e *Basidiomycota* abrigam fungos com crescimento predominantemente unicelular denominados leveduras. As leveduras reproduzem-se principalmente por fissão ou brotamento e não apresentam corpos de frutificação, mas também podem produzir esporos sexuais (ascósporos e basidiósporos). São isoladas de múltiplas fontes: néctar de flores, resinas de árvores, superfícies de plantas, água doce e marinha, solo, frutos, animais, corpo humano e detritos em geral (MADIGAN et al., 2010).

As plantas são reconhecidas como o maior habitat microbiano terrestre, perfazendo cerca de 6×10^8 km² de superfícies disponíveis à colonização (LINDOW; BRANDL, 2003). Comportam distintas associações com os microrganismos: há os residentes epífitos e endófitos ou da rizosfera (raízes), e os transientes, saprófitos ou inespecíficos. O grupo das leveduras interage de forma bastante peculiar com os microhabitats das plantas e tem papel

fundamental na modulação do equilíbrio entre os demais organismos presentes (FONSECA; INÁCIO, 2004).

As células vegetais são compostas principalmente por compostos lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina), polímeros estruturais dificilmente digeridos pela maior parte dos organismos. Os fungos secretam diversas enzimas capazes de romper essas moléculas, e atuam como os maiores decompositores e recicladores da matéria na natureza. Além da atividade microbiana, também influenciam o processo de decomposição as condições ambientais e as características dos detritos (origem, tipo, tamanho e qualidade química) (BIANCHINI JR., 2003).

Os ecossistemas aquáticos são especialmente beneficiados pela atividade enzimática dos fungos: deste modo os nutrientes do detrito foliar são dissolvidos e disponibilizados na coluna d'água, o que estimula a produtividade primária, secundária e a alça microbiana e garante o balanço energético destes ambientes (MORIARTY, 1997). Admite-se que os fungos sejam os decompositores primários da matéria vegetal, enquanto as bactérias atuam secundariamente sobre os compostos pré-processados e liberados pelos fungos (BENNER et al., 1986; NEWELL et al., 1989). Contudo, esta visão tem se tornado muito simplista, visto que já se verificaram interações, benéficas ou não, entre estes grupos durante a degradação de resíduos vegetais (BUCHAN et al., 2003).

Os estudos que avaliam a totalidade da diversidade e a sucessão de microrganismos decompositores pouco informam sobre o papel das leveduras ao longo do processo: o conhecimento sobre a participação das bactérias e fungos filamentosos é muito superior. Os trabalhos prévios sobre a

biodiversidade de leveduras em ambientes aquáticos contemplaram regiões de clima temperado, sendo escassas as pesquisas desenvolvidas em regiões tropicais. Muitos destes trabalhos revelaram espécies novas de leveduras (GARCÍA et al. 2010; LIMTONG; RAJA et al., 2010; YONGMANITCHAI, 2010; RUSSO et al., 2010; AM-IN et al., 2011; FELL et al., 2011; NITYION et al., 2011).

Kitamoto e colaboradores (2011) verificaram a atividade de degradação de compostos plásticos em leveduras isoladas do filoplano. Outros estudos com leveduras de ambientes tropicais demonstraram o potencial destes microrganismos na produção de diversas enzimas de interesse industrial (ABRANCHES et al. 1997; BUZZINI; MARTINI, 2002; FUENTEFRIA; VALENTE, 2005; LANDELL, 2006; 2010). Portanto, ainda há muito a ser explorado no campo da diversidade e do potencial biotecnológico de leveduras ambientais em ecossistemas aquáticos tropicais.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo é avaliar a comunidade de leveduras associada ao detrito de macrófitas aquáticas em decomposição numa marisma da Lagoa dos Patos, situada no litoral sul do Rio Grande do Sul. Os objetivos específicos consistem em:

- analisar a quantidade e a diversidade de leveduras associadas ao detrito das macrófitas aquáticas: *Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora* e *Scirpus maritimus*;

- relacionar a quantidade e a diversidade de leveduras às taxas de perda de massa e ao grau de decomposição das macrófitas em diferentes tempos de análise, percebendo se há espécies mais representativas na totalidade ou em alguma etapa do processo;

- verificar se a composição específica da comunidade de leveduras isolada das plantas em decomposição é influenciada: pela espécie de macrófita, pela qualidade química do detrito e pelas condições ambientais (temperatura do ar e da água, salinidade e precipitação);

- avaliar qualitativamente e quantitativamente a capacidade das leveduras degradarem tributirina e tween 80 (atividade de lipases), caseína e gelatina (atividade de proteases), e amido e carboximetilcelulose (CMC) (atividade de polissacarases);

- aferir se há perfis enzimáticos característicos dos isolados de determinada espécie de macrófita ou período de decomposição e se os maiores índices de atividade enzimática corresponderam aos isolados obtidos em períodos com maior perda de massa dos detritos.

3. HIPÓTESES

O presente trabalho admite *a priori* que:

- as leveduras associam-se a detritos e participam da decomposição de plantas de marisma;

- a qualidade do detrito das macrófitas, a quantidade de leveduras associadas e a porcentagem de perda de massa dos detritos variam conforme a espécie e o tempo de incubação da macrófita no ambiente;

- a comunidade de leveduras é afetada pelo tipo de macrófita, pela qualidade do detrito, pelo tempo de incubação e pelas condições ambientais (temperatura do ar e da água, salinidade e precipitação);

- uma vez que estes ambientes sejam pouco pesquisados, há a possibilidade de se isolar espécies de leveduras ainda não descritas;

- as leveduras colonizadoras do detrito podem degradar compostos do meio através da liberação de enzimas especializadas;

- o perfil enzimático das leveduras diferirá conforme a espécie de macrófita e o grau/tempo de decomposição do detrito.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 MARISMAS

As marismas são ecossistemas úmidos entremarés, caracterizados pela presença de densa vegetação herbácea emergente adaptada às condições saturadas do solo (CETESB, 2013). Situam-se próximas à foz de um rio, podendo estar associadas a zonas estuarinas e deltaicas, e são inundadas conforme a variação local da maré e da descarga fluvial. Têm distribuição global, ocorrendo principalmente nas médias e altas latitudes, sendo substituídas por manguezais nas costas tropicais e subtropicais (DEEGAN et al., 2012). As marismas brasileiras são predominantes nas regiões costeiras ao sul da latitude 29°S (Laguna - SC); ocupando 7.375 ha da costa do Rio Grande do Sul e concentrando 6.837 ha destas áreas somente no entorno do estuário da Lagoa dos Patos, a maior lagoa costeira da América do Sul, litoral sul do estado (COIMBRA; COSTA, 2006).

São ambientes de alto dinamismo, havendo grandes variações no nível da água, na salinidade (tornam-se usualmente hipersalinos), na temperatura e no aporte de nutrientes, e por isso abrigam organismos bem adaptados a estes tipos de estresse ambiental. A comunidade vegetal é composta por angiospermas herbáceas predominantemente halófitas, fisicamente estruturadas como as plantas do mangue, em função do grau e tempo de inundação de cada zona: há espécies de marismas baixas (permanentemente inundadas), médias (ocasionalmente inundadas) e altas (raramente inundadas) (CHAPMAN, 1934; RANWELL, 1972; ELEUTERIUS; ELEUTERIUS, 1979).

A morfologia das plantas e a diversidade fisiográfica das marismas geram heterogeneidade espacial (planos vegetados, não vegetados, canais de marés, etc.), possibilitando uma ampla variedade de nichos e refletindo na diversidade, abundância e distribuição da vida nestes ecossistemas (COSTA, 1997 APUD COSTA; MARANGONI, 2010). Poaceae, Juncaceae, Asteraceae, e Cyperaceae são as principais famílias representantes da flora das marismas de diferentes regiões geográficas. Diferentes espécies de crustáceos, moluscos, aves e peixes compõem a rica fauna que habita ou repousa nestes locais (ADAM, 1993). São áreas de preservação permanente, respaldadas no Brasil pelas legislações federal (Lei n.º 4.771, Código Florestal de 1965) e municipal (Lei n.º 4.116, Lei de Regulamentação de Ocupação dos Espaços Naturais de 1986).

As marismas concentram o carbono das espécies vegetais que abrigam e ao mesmo tempo atuam como fonte de matéria orgânica para outros pontos do estuário e mesmo para regiões oceânicas, suportando altas taxas de produtividade primária (COSTA, 1997 APUD COSTA; MARANGONI, 2010). Porém, este material contém altos teores de celulose e lignina, polímeros estruturais altamente complexos cujas cadeias carbônicas apenas microrganismos especializados são capazes de romper. A decomposição microbiana é crucial para a produção do detrito foliar e para o aproveitamento energético dos nutrientes pelos organismos estuarinos de níveis tróficos superiores, dirigindo o caminho mais importante de transferência de energia dentro dos estuários: a teia alimentar detritívora. Retrabalhada pelas comunidades microbianas, a biomassa de detritos é enriquecida nutricionalmente com biomoléculas produzidas pelos microrganismos

(aminoácidos, proteínas, vitaminas, dentre outras), torna-se mais palatável e pode ser consumida diretamente por muitas espécies de peixes e crustáceos (STOECKER, CAPUZZO; 1990; FAGERBAKKE et al. 1996). Tal processo vem sendo apontado como responsável pelo sustento de importantes recursos pesqueiros (DAY et al., 1989; ADAM, 1993; HICKENBICK et al., 2004; ABREU et. al., 2006; COSTA; MARANGONI, 2010).

Além do valor ecológico e econômico, as marismas ocupam uma zona de interface crítica entre o continente e o mar e atuam como importantes agentes geomorfológicos formadores da costa: são barreiras físicas contra os avanços do mar, favorecem a deposição e fixação de sedimentos, reduzem a hidrodinâmica e, conseqüentemente, o processo de erosão sob a costa (COSTA; MARANGONI, 2010; SHEPARD; CRAIN; BECK, 2011). Constanza e colaboradores (2008) estimaram que as áreas alagadas da costa dos Estados Unidos representam aos cofres públicos uma economia em serviços de proteção contra tempestades de mais de 23 bilhões de dólares por ano. Globalmente, entre um quarto e metade da área total das marismas vêm sendo degradadas e perdidas por motivos diversos (DEEGAN et al., 2008). As principais causas da supressão destes ambientes são as construções costeiras (piers, diques e canais artificiais); alterações no nível do mar; tempestades; poluição (esgotos, óleo, metais pesados); e aumento de áreas cultiváveis na agricultura; atividades estas que se intensificam desde o século passado (KENISH, 2001).

4.2 DECOMPOSIÇÃO DAS MACRÓFITAS AQUÁTICAS

Detrito é definido como qualquer forma não viva de matéria orgânica, incluindo produtos de excreção e exsudação dos organismos (MOORE et al., 2004). A decomposição caracteriza-se pela gradual mudança de estado dos detritos vegetais ocasionada pela ação conjunta de fatores físicos, químicos e biológicos. A expressão mais simples de mudança de estado de um recurso é verificada a partir de sua perda de massa. Análises mais detalhadas revelam que tal decaimento é constituído por uma perda de matéria e uma mudança na composição química do detrito. O ciclo completo resulta na conversão de substratos orgânicos em produtos inorgânicos, que serão novamente incorporados no processo da fotossíntese (SWIFT et al., 1979; WETZEL; LIKENS, 1991; BATTLE; MIHUC, 2000).

A eficiência da decomposição depende dos mecanismos de lixiviação (solubilização de compostos lábeis), imobilização (metabolização ou manutenção de um elemento na sua forma orgânica) e mineralização (liberação das formas inorgânicas na catabolização de um recurso) (SCIESSERE, 2007; BITAR; BIANCHINI JR., 2002). Influenciam neste processo as comunidades associadas (microrganismos, nematódeos, oligoquetos, artrópodes, moluscos e crustáceos); as condições do ambiente (temperatura, nutrientes, pH, salinidade e concentração de oxigênio dissolvido); e a origem, tipo, tamanho e qualidade química dos detritos (BIANCHINI JR., 2003).

Os detritos vegetais são compostos, sumariamente, por: celulose (10 a 50% do peso seco); hemicelulose e lignina (10 a 30% do peso seco, isoladamente); fração hidrossolúvel - açúcares, aminoácidos e ácidos alifáticos

(5 a 30% do peso seco); fração solúvel em éter e álcool - gorduras, óleos, resinas, ceras e pigmentos; proteínas vegetais (ricas em elementos como N e S); e cinzas - constituintes minerais (1 a 13% do peso seco) (ALEXANDER, 1977; BIANCHINI JR., 2003). A matéria orgânica apresenta-se no ambiente sob as formas dissolvida e particulada.

A matéria orgânica dissolvida é estruturalmente simples e lábil. A maior parte da demanda de oxigênio gerada pela decomposição das macrófitas é oriunda do carbono orgânico dissolvido, que é facilmente assimilado e rapidamente degradado pela microbiota local. Nesta classe encontram-se os carboidratos; as vitaminas, importantes fatores acessórios de crescimento; os glicosídeos e os polifenóis, substâncias que podem favorecer ou inibir o metabolismo dos organismos aquáticos. Sob este formato, a matéria orgânica absorve parcialmente a luz incidente sob a coluna d'água, podendo interferir nas reações fotossintéticas do meio (BIANCHINI JR., 1999).

A matéria orgânica particulada, de maior complexidade química, é composta principalmente por celulose e lignina, elementos de alto peso molecular, e hemicelulose. Correspondem a estes polímeros até 70% do peso seco do detrito das macrófitas aquáticas (BIANCHINI JR., 2003). A maior parte da biomassa destas plantas (até 80%) é formada por fibras cuja proporção polissacarídeos: lignina varia entre 1,75:1 e 7:1, o que as caracteriza como recursos mistos, que originarão tanto material dissolvido quanto particulado (MACCUBBIM; HODSON, 1980; BIANCHINI JR.; TOLEDO, 1996; HENRY-SILVA et al., 2001). A proporção entre estes compostos varia entre as espécies e é o determinante principal das taxas de decomposição (SCIESSERE, 2007).

A primeira etapa da decomposição se dá pela lixiviação dos compostos hidrossolúveis das porções senescentes da planta, um período curto no qual altas taxas de perda de massa são alcançadas (aproximadamente 25% da massa inicial é degradada) (WEBSTER, BENFIELD, 1986). A fragmentação reduz o tamanho original do detrito, estando comumente relacionada com a turbulência das águas, as intempéries climáticas, a ação dos ventos e atividade de alimentação de macro-organismos (LUSH; HYNES, 1973; SWIFT et al., 1979).

As partículas podem ser decompostas sob a presença ou ausência de oxigênio, dependendo do compartimento que se encontrarem (coluna d'água, sedimento, interface sedimento-água). A decomposição anaeróbica é realizada através de diferentes vias, podendo utilizar nitrato, sulfato ou gás carbônico como aceptores de elétrons. A energia é armazenada em compostos intermediários como ácido sulfídrico e metano, que podem ser carreados a zonas aeróbias e oxidados (LYNCH; HOBBIE, 1988; SCIESSERE, 2011).

A decomposição do detrito é mais lenta, dependente da colonização do detrito por fungos e bactérias e da atividade enzimática destes microrganismos: quanto maior for a concentração inicial de nutrientes da planta e de compostos refratários, como os lignocelulósicos e os húmicos, maior a duração desta etapa (ALLAN, 1996; APRILE et al., 1999). Estima-se que a velocidade média de perda de massa da matéria orgânica lábil oriunda das macrófitas aquáticas é 100 vezes maior do que a mineralização da matéria orgânica refratária (BIANCHINI, JR., 2003). A celulose e a hemicelulose são degradadas a velocidades próximas da perda de massa, enquanto a lignina, assim como os

elementos a ela complexados, é decomposta mais vagarosamente, acumulando-se no ambiente (ALLAN, 1996).

As frações da matéria orgânica não consumidas, juntamente com as ressintetizadas, geram um excedente que se acumula no ambiente, principalmente no sedimento, resultando na formação de ácidos húmicos. Contudo, em ecossistemas tropicais a mineralização dos detritos tem alto rendimento e tende a competir até mesmo com a humificação (BIANCHINI JR., 1985; BIANCHINI JR. et al, 2004).

4.3 ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DECOMPOSIÇÃO VEGETAL

A degradação da matéria orgânica particulada pela microbiota colonizadora dos detritos requer um aparato enzimático bastante específico, contendo principalmente enzimas extracelulares, que são difusíveis através das membranas celulares e podem ser secretadas ou estar aderidas na superfície celular. A expressão destas enzimas é regulada pela disponibilidade de nutrientes do meio, sendo produzidas conforme o equilíbrio entre a composição da biomassa vegetal e de seus detritos, a eficiência de assimilação dos nutrientes e o crescimento microbiano. A atividade destas enzimas é uma medida funcional do controle metabólico dos organismos sob as mudanças nutricionais do ambiente e do fluxo de energia dentro da comunidade (SINSABAUGH et al., 2009).

Os microrganismos têm dois tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: sistemas hidrolíticos, que produzem hidrolases e degradam principalmente celulose e hemicelulose; e um sistema único lignolítico e oxidativo, capaz de despolimerizar a lignina (PÉREZ et al., 2002). A maioria

das enzimas produzidas em ecossistemas aquáticos é secretada constantemente, a baixos níveis, e tem papel substancial nestes ambientes (CHRÓST, 1991). As taxas de decomposição dos detritos também são favorecidas pela atividade do plâncton fotoautototrófico, que pode interferir nas condições de oxi-redução e acidez do meio, criando condições favoráveis e incrementando a atividade de enzimas microbianas oxidativas e hidrolíticas (CUNHA-SANTINO et al., 2003). A ação sinérgica de diferentes microrganismos sobre compostos orgânicos complexos permite que as moléculas mais simples oriundas destas reações possam ser consumidas, inclusive por microrganismos que não apresentam aparato enzimático compatível com estes substratos (GOLUEKE, 1991; GOLUEKE 1992).

A celulose é o principal constituinte das células vegetais, sendo o polissacarídeo mais abundante da Terra. Sua composição química consiste em resíduos de D-glicose conectados por ligações glicosídicas β -1,4, os quais formam longas cadeias lineares. Contém regiões cristalinas, nas quais as cadeias individuais estão ligadas umas às outras e rigidamente organizadas, e regiões amorfas, menos ordenadas, mais suscetíveis à degradação (BALDRIAN; VALÁSKOVÁ, 2008). O padrão de ligação entre as cadeias de D-glicose gera fibras que podem ser encontradas na forma pura ou embebidas em uma matriz contendo hemicelulose e lignina, o que resulta em uma composição molecular bastante complexa (HORN, 1994). Variações no grau de acessibilidade e cristalinidade da celulose são a base da diferenciação de nicho entre os microrganismos celulolíticos.

As principais enzimas envolvidas na degradação da celulose são as endoglicanases, exoglicanases e celobiohidrolases. As endoglicanases

hidrolisam randomicamente as ligações glicosídicas β -1,4, gerando oligossacarídeos com diferentes terminações, sob as quais atuam as exoglicanases, ocorrendo a liberação final de celobiose. A celobiose ou celo-oligossacarídeos residuais podem sofrer desidrogenação por celobiose desidrogenases ou ser reduzidos em monômeros de glicose pela ação das β -glicosidades (BALDRIAN; VALÁSKOVÁ, 2008; CUNHA-SANTINO et al., 2008).

As celulases - conjunto de enzimas que atuam na quebra da celulose - são categorizadas em diferentes famílias enzimáticas, sugerindo-se que a especificidade por um substrato comum surgiu como um processo de evolução convergente (LYND et al., 2002). As celulases exibem uma ampla especificidade e podem atuar em substratos similares: endoglicanases agem também sobre hemicelulose, galactomanana, galactoglucomanana ou manana (KELISH et al., 1969); xilanas podem ser degradadas por alguns tipos de endoglicanases e celobiohidrolases (COHEN et al., 2005; VALÁSKOVÁ; BALDRIAN, 2006); β -glicosidades, embora tenham alto grau de especificidade, podem clivar hemicelulose, manose, xilose e galactose (BALDRIAN; VALÁSKOVÁ, 2008).

A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante no mundo (BIAN et al., 2010), preenche lacunas do tecido vegetal; forma a matriz que envolve as fibras de celulose e une a lignina a estas fibras, interferindo no grau de agregação e no padrão de ligações intermoleculares destes compostos; e tem função na regulação da estrutura terciária na formação da parede celular (ATALLA et al., 2002). É um carboidrato complexo, de baixo peso molecular, que pode compreender de 20 a 35% da biomassa de compostos lignocelulósicos (SAHA, 2003).

Comparada à celulose, a principal diferença consiste na diversidade de açúcares que constituem as hemiceluloses: D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose, L-arabinose ou ácidos 4-O-metil-glicurônico, D-galacturônico e D-glicurônico. Os monômeros são dispostos em curtas cadeias laterais e geralmente unidos por ligações glicosídicas β -1,4, e menos frequentemente por ligações glicosídicas β -1,3. Tem estrutura não-cristalina, ramificada, ionizada e não forma agregados, mesmo quando co-cristalinizados com cadeias de celulose, e reduzem-se a açúcares e ácido acético ao serem biodegradadas (PÉREZ et al., 2002). Graças à ampla diversidade de hemiceluloses, a degradação deste polímero requer a ação conjunta de mais de 24 enzimas (AHMED et al., 2001).

A xilana, um dos exemplos mais comuns de hemicelulose, é primariamente hidrolisada por β -1,4-endoxilanases, gerando xilano-oligossacarídeos. Sobre essas moléculas ainda atuam as β -xilosidades, que reduzem os oligossacarídeos a monômeros de xilose, e algumas enzimas acessórias (xilano esterases, esterases ferúlicas e p-cumáricas, arabinofurosidades e metil-glicuronosidasas), que paralelamente hidrolisam xilanas e manoses em sinergia com as demais enzimas (PÉREZ et al., 2002; SAHA, 2003).

A lignina confere às células das plantas suporte estrutural, impermeabilidade e resistência ao estresse oxidativo e ao ataque microbiano. São polímeros com estrutura amorfa e heterogênea, não solúveis em água e opticamente inativos. Configuram o material recalcitrante mais resistente à decomposição biológica, pois, diferentemente dos outros polímeros, consistem em subunidades de fenil-propano conectadas por ligações C-C e aril-éter

(PÉREZ et al., 2002). A despolimerização inicial da lignina pode liberar produtos instáveis, suscetíveis a diferentes reações não específicas de oxidação, referidas como “combustão enzimática” (KIRK; FARREL, 1987).

As duas principais famílias de enzimas que atuam sobre a lignina são as peroxidases (lignina peroxidases e peroxidases dependentes de manganês) e as lacases, que utilizam mediadores de baixo peso molecular para executar o processo de quebra da molécula. Adicionalmente, enzimas redutivas como celobiose e aril-álcool oxidases e aril álcool desidrogenases também atuam na quebra da lignina, processo que ocorre estritamente em condições aeróbicas (CULLE, 1997; BOER et al., 2005).

A degradação aeróbica da celulose e da lignina é amplamente distribuída entre os fungos, principalmente entre *Basidiomycota* e *Ascomycota* (ABDEL-RAHEEM; SHEARER, 2002; BOER et al., 2005). A celulose também é degradada por bactérias filamentosas (*Streptomyces*, *Micromonospora*) e não filamentosas (*Bacillus*, *Cellulomonas*, *Cytophaga*) (COOKE; RAYNER, 1984; LYND et al., 2002). A lignina é majoritariamente degradada por basidiomicetos coletivamente chamados de “fungos da podridão branca” (BOER et al., 2005). A hemicelulose é principalmente processada por xilanases, enzimas que têm sido descritas em actinobactérias *Thermomonospora* e *Actinomadura*, e em bactérias *Bacillus* sp. e *Streptomyces viridosporus* (BLANCA et al., 1999; GEORGE et al., 2001). As endomananases têm sido descritas em fungos da podridão branca e ascomicetos (KIRK; CULLEN, 1998). Os fungos da podridão branca também têm sido os principais produtores das α -galactosidases e β -manosidases descritos na literatura (PÉREZ et al., 2002).

Os microrganismos colonizadores dos detritos também participam da decomposição dos vegetais através da produção de enzimas que degradam outras moléculas: lipases - os lipídeos são os principais componentes da cutina das plantas; amilases, o amido é a substância de reserva de energia nos vegetais; e proteinases, os vegetais são compostos por uma infinidade de proteínas (proteínas estruturais, proteínas de defesa, e. g.). Mautone e colaboradores (2010) avaliaram a capacidade degradativa que as leveduras do filoplano de diferentes espécies de planta apresentavam, revelando a produção de esterases, amilases, caseinases, e gelatinases, indicando que as leveduras do filoplano são boas fontes de enzimas de interesse industrial. Uma ampla gama de leveduras ascomicéticas já foi reportada pela produção de amilases (MOT et al., 1994). Uma amilase termoestável de uma cepa de *Cryptococcus* já foi estudada para fins de aplicabilidade industrial (IEFUJI et al., 1996). Isolados de leveduras de ambientes polares produzem eficientemente enzimas comumente encontradas em leveduras do filoplano (TURCHETTI et al., 2008; LOPERENA et al., 2012).

4.4 MICROBIOTA DECOMPOSITORA

Bactérias e fungos interagem em sinergia e antagonismo ao colonizar os tecidos vegetais, influenciando diretamente o processo de decomposição como um todo (MILLE-LINDBLOM; TRANVIK, 2002). Alguns estudos sugerem que são raras as espécies dominantes nas comunidades bacterianas, estando estas dispostas uniformemente e coexistindo sob os substratos vegetais na maioria das vezes em baixa frequência (ZHOU et al., 2002; STACH et al., 2003). A dominância indica a presença de poucas espécies adaptadas à

competição por determinados recursos de um ambiente. Contrariamente às bactérias, a estrutura das comunidades fúngicas não é muito bem compreendida, mas evidências têm indicado que a microbiota associada às plantas é altamente diversa (VANDENKOORNHUYSE et al., 2000; SCHADT et al., 2003; GANLEY et al., 2004).

O grupo mais abundante na filosfera e melhor estudado neste contexto é o das bactérias. Leveduras e fungos leveduriformes (“*yeast-like fungi*”) são organismos bastante ativos no filoplano. Os fungos leveduriformes são fungos unicelulares com habilidade de desenvolver estrutura de micélio em resposta às condições ambientais, ou seja: ora se comportam como leveduras, ora como fungos filamentosos. Tal característica é mais comum em *Ascomycota*. As leveduras negras, pertencentes ao grupo dos fungos leveduriformes, apresentam parede celular melanizada, exibem crescimento micelial e geram conídias (STERFLINGER, 2006), representando o grupo mais ativo dentre os fungos decompositores. Os fungos filamentosos são colonizadores transientes, pois estão presentes nas folhas principalmente na forma de esporos dormentes (ANDREWS; HARRIS, 2000; LINDOW; BRANDL, 2003; WHIPPS et al., 2008).

Avaliando-se simultaneamente a atividade decompositora destes microrganismos nas marismas, tem-se hipotetizado o fracionamento temporal na exploração dos recursos disponíveis: a transformação inicial da matéria orgânica se dá com a atividade enzimática dos fungos; enquanto as bactérias colonizam gradualmente o detrito pré-processado, participando significativamente na decomposição tardia (BENNER et al., 1986; NEWELL et al., 1989). Macrófitas aquáticas do gênero *Spartina*, plantas de marismas

bastante estudadas, podem perder até 60% da massa inicial no estágio da decomposição dominado pela colonização fúngica (NEWELL; PORTER, 2000).

No entanto, esta visão de segregação temporal entre fungos e bactérias tem se revelado muito simplista e insuficiente pra explicar diversas questões relacionadas à decomposição (BUCHAN et al., 2003). Bactérias e fungos metabolicamente ativos têm ocorrido concomitantemente nos detritos de *Spartina* (NEWELL; PALM, 1998). Uma ampla visão, que reconheça o potencial para interações fisiológicas e ecológicas entre a coocorrência destes grupos, pode ser uma perspectiva mais valorosa e coerente para o direcionamento da matéria orgânica vegetal nos ecossistemas costeiros (MILLE-LINDBLOM; TRANVIK, 2002).

As comunidades microbianas decompositoras das marismas vêm apresentando baixa a moderada variabilidade espacial, mas vêm variando consideravelmente com o passar do tempo de decomposição. Tal variabilidade não pode ser simplesmente explicada pela sucessão de organismos nem pela correlação com fatores ambientais. Ao longo de todo o processo de decomposição tem-se observado correlações positivas e negativas entre a abundância de fungos e bactérias, interações ecológicas que influenciam diretamente tal variabilidade (BUCHAN et al., 2003).

4.5 MÉTODOS DE ESTUDO APLICADOS

4.5.1 Tipos de ensaio e caracterização do substrato

O método mais comum de analisar a decomposição de detritos foliares é denominado “*litter bags*” (sacos de decomposição) (FALCONER et al., 1933;

LUNT, 1993). São embalagens vazadas, normalmente feitas com tela plástica de malha variável, nas quais são depositados fragmentos das plantas estudadas. Pode, muitas vezes, subestimar as taxas de decomposição avaliadas, mas é bem difundido que os resultados dos *litter bags* refletem confiavelmente as características da matéria vegetal ao longo do tempo, permitindo comparações entre locais, espécies e manipulações experimentais (KELMAN; LANG, 1982; WETZEL; LIKENS, 1991). O método também vem sendo aplicado na análise das comunidades microbianas decompositoras *in situ* de diversos ambientes, incluindo as marismas (KUEHN; SUBERKROPP, 1998; HICKENBICK et al., 2004; SIMÕES et al., 2011; SNAJDR et al., 2011; SILVEIRA, 2012).

A principal medida de decomposição da matéria vegetal ao longo do tempo é a perda de massa dos detritos contidos nos “*litter bags*”. Os ensaios realizados *in vitro* com câmaras de decomposição, medem a degradação dos detritos através do consumo de oxigênio e das evoluções de dióxido de carbono e metano (THOMAZ et al., 2004).

Os principais elementos analisados para caracterizar o material em decomposição são C (elemento que corresponde até 50% do peso seco das macrófitas aquáticas) e N (até 4% do peso seco das macrófitas aquáticas) (BIANCHINI JR.; CUNHA-SANTINO, 2008). O detrito tem maior complexidade química e qualidade nutricional quanto maior for a razão C:N de sua composição. As taxas de decomposição têm sido correlacionadas positivamente com a concentração inicial de N e negativamente correlacionadas com a razão C:N (maior quantidade de compostos estruturais complexos nas células vegetais) (SIMÕES et al., 2011).

4.5.2 Standing litter

Um importante fator a ser considerado em estudos de decomposição é que o processo inicia-se na planta viva, muitas vezes antes de ocorrer o processo de abscisão e queda da porção senescente, referida como “*standing litter*” (NEWELL, 1983). Barlöcher e Biddiscombe (1996) mostraram que mesmo antes de cair ao solo, a maioria das folhas senescentes de *Typha latifolia* já perde peso. A microbiota colonizadora da parte aérea das plantas atua pontualmente, mas se mantém sob a planta parental. Tal mecanismo favorece o acúmulo de material particulado no ambiente de origem, o que é de suma importância na manutenção de ecossistemas como as marismas (CHRISTIAN et al., 1990; NEWELL, 1993; NEWELL, 1996; BÄRLOCHER; BIDDISCOMBE, 1996; SAMIAJI; BÄRLOCHER, 1996).

A geração do detrito vegetal desde a planta viva também vem sendo ponderada em muitos estudos em ecologia de marismas, tornando a análise da comunidade microbiana decompositora mais completa (NEWELL, 1993; ARSUFFI; PALM, 1996; NEWELL, 1996; NEWELL et al. 1996; NEWELL et al. 1989). Alguns destes estudos diferenciam as folhas coletadas em decomposição inicial e tardia: aquelas em estágio inicial fazem parte da face aérea da planta, enquanto aquelas em estágio tardio, embora ainda anexadas à planta, encontram-se colapsadas com o solo (BUCHAN et al., 2003; LYONS et al. 2010).

4.5.3 Isótopos estáveis

Isótopos estáveis são átomos de um mesmo elemento que apresentam nuvens de elétrons iguais (mesmas propriedades químicas), mas núcleos de

configurações diferentes, o que também torna a massa e as propriedades físicas destes átomos diferentes e permite traçar a origem de determinados elementos. Cada relação isotópica requer uma técnica específica de marcação, mas em linhas gerais depende do uso de cromatógrafos e espectrômetro de massas.

A maior parte dos trabalhos utilizando marcação isotópica foca na contribuição das macrófitas em ecossistemas aquáticos (estuários, lagos, rios) (BRISTOW et al., 2013; COUTO et al., 2013) e o fluxo de carbono para as teias tróficas locais (ABREU et al., 2006; FRANÇA et al. 2011; BAKER et al., 2013). No entanto, outros estudos vêm sendo mais direcionados a explorar aspectos da ecologia microbiana destes ambientes.

Compostos lignocelulósicos marcados com ^{14}C já foram utilizados para avaliar a contribuição de fungos aquáticos na decomposição das macrófitas *Spartina alterniflora* (BENNER et al., 1984) e *Carex walkeriana* (BERGBAUER et al., 1992). Verificou-se que os compostos lignocelulósicos de *S. alterniflora* foram degradados duas vezes mais lentamente do que os demais polissacarídeos desta macrófita, enquanto para *C. walkeriana* a taxa foi até cinco vezes inferior.

Microrganismos oxidantes de metano já foram mapeados e quantificados em sedimentos (CABRAL et al., 2010) e em áreas de turfa (GUPTA et al., 2013) deste modo. España e colaboradores (2011) combinaram análises de RNAr 18S com o uso de sondas de DNA marcadas com ^{15}N para identificar os fungos envolvidos com a degradação da matéria orgânica no sedimento. Wing e colegas (2012) utilizaram a técnica para analisar o quanto as comunidades microbianas de um glacial costeiro da Antártica contribuem

para a produtividade das comunidades do Atlântico, indicando que as mudanças climáticas globais poderão afetar a produtividade secundária e a estabilidade das teias alimentares nos polos.

4.5.4 Métodos tradicionais

Os métodos tradicionais de análise de microrganismos decompositores incluem análises microscópicas e obtenção de culturas puras dos microrganismos. O exame microscópico de amostras *in situ* fornece informações importantes sobre a distribuição espacial, o biovolume, os ciclos de geração e a abundância dos fungos no ambiente, elementos que não podem ser caracterizados utilizando-se apenas ferramentas moleculares (BUESING et al., 2005). Ao mesmo tempo, a heterogeneidade filogenética dos fungos de ecossistemas aquáticos, locais que abrigam desde primitivos fungos zoospóricos até os desenvolvidos hifomicetos, torna a identificação microscópica uma técnica laboriosa, na qual há grande margem de erro (WURZBACHER et al., 2010).

Há diferentes protocolos de coloração de hifas, aplicando-se os mais variados corantes no processo (ELLIS et al., 2007). A nova geração de corantes inclui fluoróforos específicos, usualmente empregados em formas filamentosas e leveduras. Os compostos da parede celular são os principais alvos destes marcadores: glicanas, lecitinas (Calcofluor White), anticorpos monoclonais espécie-específicos e domínios de quitina (ROBIN et al., 1986; BERMINGHAM et al., 1995; SCHÜBLES et al., 1996; MARSHALL et al., 1997; RACHINI et al., 2007). Apesar da especificidade destes corantes vir sendo questionada, assume-se que o método é eficiente para reconhecer os

diferentes grupos de fungos quando complementado com análises de morfologia celular (HICKEY et al., 2005).

4.5.5 Fluorescence *in situ* hybridization - FISH

Outra abordagem microscópica dirigida ao estudo da atividade e filogenia dos fungos é a hibridização *in situ* de sondas de oligonucleotídeos de RNA ribossômico marcadas por fluorescência (FISH - “*fluorescence in situ hybridization*”). O método tem sido aplicado tanto em coleções de fungos previamente isolados quanto diretamente em amostras ambientais, tendo esta última análise algumas implicações metodológicas (e. g. autofluorescência do substrato). A intensidade diferencial entre o sinal de células de uma mesma hifa também tem sido problemática, uma vez que estas apresentam distinta atividade metabólica ou permeabilidade às sondas (WURZBACHER et al., 2010).

Bons resultados foram obtidos para *Aureobasidium pullulans* ao se utilizar sondas com múltiplas marcações e prévia digestão enzimática da parede celular (LI et al., 1997, SPEAR et al., 1999). A digestão enzimática da parede celular (lise de glicanas ou quitina) e agentes químicos posteriores à fixação das células aumentam a difusão das sondas moleculares (SPEAR et al., 1999; CIMINO et al., 2006). Baseando-se na acessibilidade das sondas às regiões de RNAr, foram inventariados mapas de variabilidade tanto de regiões da subunidade maior (LSU, “*larger subunit*”) (INACIO et al., 2003; RÖDER et al., 2007), quanto da subunidade menor (SSU, “*small subunit*”) ribossômica (BEHRENS et al., 2003; BAKER et al., 2004).

4.5.6 Biomassa

A biomassa é frequentemente escolhida como uma forma de estimar a abundância de um grupo de organismos. O emprego de métodos acurados e confiáveis para determinar a biomassa microbiana das plantas é essencial para quantitativamente avaliar seu papel em funções no ambiente tais como: decomposição, ciclos de nutrientes e cadeia alimentar (NEWELL, 1992; NEWELL, 1993; GESSNER; NEWELL, 2002; GESSNER et al., 2003; KLEIN; PASCHKE, 2004; GESSNER et al., 2007; SUBERKROPP, 2008). O uso de biomarcadores permite traçar a origem e os processos de evolução da matéria orgânica (MUDGE; NORRIS, 1997). Como os fungos degradam as macromoléculas por penetração interna do micélio no substrato vegetal, é difícil distinguir a biomassa fúngica das células da planta, o que torna confusa a identificação e distinção morfológica entre as hifas via microscopia direta (WETZEL; LIKENS, 1991).

O ergosterol, éster presente na membrana celular de fungos metabolicamente ativos, é o biomarcador padrão para estimar a biomassa fúngica viva de *Ascomycota* e *Basidiomycota* (THOUMELIN et al., 1997; GESSNER et al., 2003). No entanto, em ambientes protegidos da luz, o ergosterol persiste mesmo após a morte dos fungos (MILLE-LINDBLOM et al., 2004). *Chitridiomycota*, *Oomycota* e alguns *Zygomycota* não contêm ergosterol, sendo estes grupos analisados por FISH, microscopia, marcadores fluorescentes de quitina ou glicana (que também podem ser quantificados por HPLC), ou atividade de proteínas (GESSNER et al., 2003; KLEIN; PASCHKE, 2004; PASCHKE, 2004; RASCONI et al., 2009; WURZBACHER et al., 2010). Os biomarcadores utilizados usualmente para bactérias são os ácidos graxos

polinsaturados contendo entre 15 e 17 carbonos (GESSNER; NEWELL, 2002). A análise destes lipídeos de membrana geralmente utiliza técnica de extração bruta em metanol e purificação em cromatografia gasosa (HPLC) (DAVIS; LAMAR, 1992).

4.5.7 Métodos moleculares

Abordagens tradicionais de cultivo são apontadas como não representativas das espécies dominantes nos ambientes marinhos (DELONG et al., 1996; DUNBAR et al., 2001), sendo crescente a utilização de métodos moleculares para analisar comunidades microbianas das marismas (BUCHAN et al., 2003; LYONS et al., 2010). Um grande número de novas taxa, muitos dos quais não são passíveis de cultivo em laboratório, vêm sendo identificados através destes métodos (SEENA et al., 2008).

O DNA "*fingerprinting*" consiste na reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores específicos para um grupo (reino, filo e.g.). As técnicas mais utilizadas na análise das sequências obtidas são eletroforese em gel desnaturante/temperatura (D/TGGE), polimorfismo do fragmento terminal (T-RFLP) e espaçadores ribossomais intergênicos (ARISA) (NIKOLCHEVA et al., 2003; NIKOLCHEVA; BÄRLOCHER, 2004; GADANHO; SAMPAIO, 2004; TORZILLI et al., 2006). Os genes mais comumente marcados e com uma ampla gama de oligonucleotídeos iniciadores disponíveis correspondem às subunidades (SSU e LSU) e espaçadores (ITS) ribossomais. Adicionalmente, em menor escala, são usados genes metabólicos mitocondriais ou β -tubulina (MITCHELL; ZUCCARO, 2006). A análise da diversidade destes genes permite comparar padrões em comunidades

conforme um gradiente espacial ou temporal (sucessão) num determinado habitat. Vem sendo empregada no estudo de fungos colonizadores de folhas submersas em rios e lagos (NIKOLCHEVA; BÄRLOCHER, 2005; RAVIRAJA et al., 2005; MILLE-LINDBLOM et al., 2006; DAS et al., 2007), na diferenciação de isolados (LIBKIND et al., 2003) e na seleção de biblioteca de clones (NEUBERT et al., 2006).

Uma técnica recente, designada PCR em tempo real, evoluiu da técnica de PCR convencional, com o objetivo de minimizar as suas numerosas limitações. Também conhecida como PCR quantitativa ou PCR em tempo real quantitativa, é um método de quantificação e amplificação simultânea do DNA. Baseia-se na detecção e quantificação de um composto fluorescente (durante as primeiras fases da PCR), assentando num princípio básico de que o aumento significativo da quantidade de produto da PCR está correlacionado com a quantidade inicial do alvo (OLIVEIRA, 2010). Diferentes grupos microbianos podem ser mensurados, em combinação com a técnica de PCR multiplex, e.g.. (PEREZ-OSORIO; FRANKLIN, 2008). A PCR quantitativa vem sendo utilizada em estudos de arqueias e bactérias oxidantes de amônia presentes nas raízes (HERMANN et al., 2008; 2009) e de fungos endófitos de macrófitas aquáticas (SANDBERG et al., 2014) ou associados a detritos de macroalgas (ZUCCARO et al., 2008),

Apesar das aparentes vantagens destes métodos, muitos detalhes devem ser ponderados ao se escolher a melhor estratégia de estudo da microbiota. Os padrões de DGGE, e.g., revelam somente os filotipos mais abundantes ($\geq 1\%$). As bibliotecas de clones são reconhecidamente mais efetivas que D/TGGE, mas também estão sujeitas a erros de clonagem ou

amplificação que afetam a interpretação dos dados. Para análise da diversidade fúngica, os erros oriundos das análises de ITS podem ser compensados com análises independentes via cultivo ou microscopia (WURZBACHER et al., 2010).

Todas as ferramentas moleculares dependem de oligonucleotídeos iniciadores de alta especificidade e baixa margem de erro, e a aplicabilidade dos mesmos requer a disponibilidade de bases de dados de qualidade (ANDERSON et al., 2003). O DNA genômico ribossomal contém regiões conservadas como SSU (17,18S) e 5.8S e outras altamente variáveis, tanto na composição quanto no comprimento, como ITS, IGS e LSU (24S, 26S) (FELL et al., 2000). O maior problema destas abordagens tem sido a escassez de sequências representativas nas bases de dados públicas.

A região SSU tem apresentado limitada resolução filogenética em nível de gênero/espécie. A região ITS tem maior resolução, inclusive em nível de espécie, mas possui extensos polimorfismos e é vulnerável a inversões e deleções, sendo problemática na construção de árvores filogenéticas (WURZBACHER et al., 2010). A região LSU é mais estável do que a ITS, e tem resolução similar em domínios divergentes (D1, D2, D7, D8, e.g.) e frequentemente é eficiente para identificação das espécies de fungos (RÖDER et al., 2007; SAMPAIO et al., 2007). Às vezes a análise isolada de uma ou outra região não é suficiente para identificar uma amostra, e então a estratégia adotada é acessar ambas as regiões do DNA (BUTINAR et al., 2007).

Ferramentas moleculares inovadoras como a metagenômica e a transcriptômica (expressão dos genes) vislumbram a totalidade da diversidade genética presente e/ou ativa em um ambiente. Permitem previsões sobre o

potencial bioquímico de uma determinada comunidade ou a caracterização de amostras ambientais para posterior validação experimental. Análises metagenômicas vêm sendo aplicadas ao estudo das comunidades microbianas da rizosfera de macrófitas aquáticas (BODELIER et al., 2006; TRIAS et al., 2012) e do epífiton de macroalgas (BURKE, 2010). As atividades metabólicas de oxidação de amônia e de transformação de mercúrio já foram monitoradas em bactérias da rizosfera de macrófitas aquáticas por transcriptômica (NIKOLAUSZ et al., 2008; COSIO et al., 2013). Tais técnicas requerem notáveis investimentos pós-experimentais em mão de obra especializada e bioinformática (BHADAURIA et al., 2007).

Apesar do elevado potencial da biologia molecular para o estudo dos fungos de ambientes aquáticos, todas as informações foram obtidas via sequenciamento carecem de contexto e de identificações acopladas a bases de dados confiáveis e abrangentes. Apenas uma pequena proporção de informações sobre fungos aquáticos já foi validada nos bancos de dados disponíveis (WURZBACHER et al., 2010). Estudos convencionais baseados em identificação morfológica por análises microscópicas (CZECZUGA et al., 2005; VAN RYCKEGEM et al., 2007) podem confirmar as identificações obtidas.

4.6 CONHECIMENTO SOBRE MICRORGANISMOS COLONIZADORES DE PLANTAS AQUÁTICAS E DETRITOS

4.6.1 Bactérias

A superfície de macroalgas e macrófitas aquáticas é abundantemente e ubiquamente colonizada por bactérias epifíticas (ARMSTRONG et al., 2000;

SHIBA; TAGA, 1980). Sabe-se há quase trinta anos que a colonização microbiana é capaz de interferir no desenvolvimento e na morfologia normal das algas verdes (MATSUO et al., 2005). A associação entre macrófitas e bactérias também é importante para a remoção de nutrientes e limpeza de águas eutrofizadas (HIORNS et al., 1995; ERIKSSON; WEISNER, 1999; ERIKSSON, 2001; CHANG et al., 2006; GORRA et al., 2007; HERRMANN et al., 2008). A **Tabela 1** resume boa parte dos estudos que já foram realizados sobre bactérias oriundas de algas e macrófitas aquáticas.

Tabela 1. Compilação de alguns estudos já realizados com enfoque na colonização bacteriana de algas e macrófitas.

Tema abordado	Grupos principais e outras informações relevantes	Planta	Referência
Promoção da morfogênese normal das algas	<i>Cytophaga, Flavobacterium, Vibrio, Pseudomonas, Halomonas, Escherichia</i> , cocos gram-positivos.	<i>Ulva lactuca</i>	PROVASOLI; PINTNER, 1980
		<i>Ulva pertusa</i>	NAKANISHI et al., 1996; NAKANISHI et al., 1999
	<i>Monostroma oxyspermum</i>	MATSUO et al., 2003; 2005	
	<i>Ulva linza</i>	FRIES, 1975; MARSHALL et al., 2006	
	<i>Ulva compressa</i>	FRIES, 1975	
	<i>Cytophaga, Flavobacterium</i>	<i>Monostroma oxyspermum</i>	MATSUO et al., 2003; 2005

	bactérias nitrificantes e desnitrificantes	<i>Potamogeton pectinatus</i> (epífiton)	ERIKSSON, 2001; ERIKSSON; WEISNER, 1999
	bactérias desnitrificantes, nitrificantes e oxidantes de amônia	<i>Ceratophyllum demersum</i> , <i>Potamogeton natans</i> , <i>Potamogeton crispus</i> , <i>Sagittaria sagittifolia</i> , <i>Sparganium emersum</i> e <i>Potamogeton pectinatus</i>	KORNER, 1999
Remoção de nutrientes e limpeza de águas eutrofizadas	<i>Nitrospira</i> <i>Archaea</i> oxidantes de amônia	<i>Phragmites australis</i> raízes <i>Littorella uniflora</i>	GORRA et al., 2007 HERRMANN et al., 2008
	efetividade de sistemas micróbio-planta testada com bactérias amonificantes, nitrificantes e desnitrificantes	<i>Eichhornia crassipes</i> e <i>Elodea nuttallii</i>	CHANG et al., 2006
	bactérias oxidantes de amônia - sondas específicas de DNA (<i>rrn</i> operon)	<i>Potamogeton pectinatus</i> e <i>Chara aspera</i> (epífiton)	COCI et al., 2011
Contagem de bactérias epifíticas	<i>Flexibacterium</i> e <i>Leucothrix</i> , cianobactérias e cocos. Média anual: 6×10^7 células cm^{-2} <i>Acinetobacter</i> , <i>Cytophaga</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Enterobacter</i> e dois grupos de	<i>Laminaria digitata</i> (epífiton) <i>Myriophyllum spicatum</i>	CORRE; PRIEUR, 1990 CHAND et al., 1992

	bactérias fastidiosas (bacilo e coco gram-negativos). Contagens entre 2,77 e 8,31 10 ⁶ células cm ⁻¹ . 4,52 × 10 ⁸ a 5,96 × 10 ⁹ células.g ⁻¹	Diversas espécies	RYBAKOVA, 2010
Presença de bactérias endofíticas	Observação microscópica <i>Arcobacter</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Flavobacteriaceae</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Labrenzia</i> , <i>Phyllobacteriaceae</i> e <i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Bryopsis</i> , <i>Penicillus</i> , <i>Halimeda</i> , <i>Udotea</i> e <i>Caulerpa</i> <i>Bryopsis</i>	BURR; WEST, 1970; TURNER; FRIEDMAN, 1974; DAWES; LOHR, 1978; COLOMBO, 1978; CHISOLM et al., 1996; DELBRIDGE et al., 2004 HOLLANTS et al., 2011
Biofilme microbiano	<i>Cytophaga-Flavobacteria- Bacteroidetes</i> (5-35% do total das células), <i>Alphaproteobacteria</i> (3-17% do total das células). <i>Betaproteobacteria</i> , <i>gammaproteobacteria</i> , actinomicetos (5-10% do total das células). <i>Pseudalteromonas tunicata</i> (até 10 ⁸ células ml ⁻¹) e <i>Roseobacter gallaeciensis</i> (dominante) <i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i>	<i>Myriophyllum spicatum</i> e <i>Chara aspera</i> <i>Ulva australis</i> <i>Phragmites australis</i>	HEMPEL et al., 2008 HUSS; WEHR, 2004 TSUCHIYA et al.,

Janthinobacterium, Pseudomonas, 2011
Pantoea, Oxalobacter,
Hymenobacter, Serratia,
Sinorhizobium, Rhodobacter,
Rhizobium, Arcicella, Methylosinus,
Duganella, Sphingomonas,
Rhodofera, Clostridium,
Acinetobacter, Massilia, Klebsiella,
Enterobacter, Geobacillus,
Thioprofundum, Flavobacterium,
Pedobacter, Dechloromonas,
Asticcacaulis, Stenotrophomonas,
Epilithonimonas, Moraxella

Isolamento de actinomicetos	Streptomycetes, <i>Pseudonocardia</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Micromonospora</i> e <i>Actinoplanes</i>	<i>Sparganium americanum</i> , <i>Microanthemum</i> <i>umbrosum</i> , <i>Ranunculus</i> <i>pusillus</i>	WOHL; MCARTHUR, 1998
Decomposição e produtividade bacteriana	Decomposição mais elevada entre os 40 e 60 dias de incubação no ambiente: redução de 60 a 95% do peso inicial em <i>Potamogeton perfoliatus</i> e de 20 a 50% em <i>Phragmites australis</i> . Altas taxas nos primeiros 4 dias do experimento (ensaio teve 30 dias de duração). Bactérias agregadas às partículas apresentaram taxas de respiração até quatro vezes maior do que as bactérias livres.	<i>Potamogeton perfoliatus</i> e <i>Phragmites australis</i> <i>Scirpus maritimus</i>	BELOVA, 1993 ANESIO et al., 2003; BREPOHL et al. 1996

Reportada interação de predação entre flagelados e bactérias. O incremento de nutrientes de origem bacteriana não foi significativo, atribuindo-se aos fungos o papel de decompositores principais neste ambiente.	<i>Spartina alterniflora</i> , <i>Spartina densiflora</i> e <i>Scirpus maritimus</i>	HICKENBICK et al. 2004
--	--	---------------------------

4.6.2 Fungos filamentosos

A “*standing litter*” tem suportado uma grande diversidade de ascomicetos e fungos anamórficos terrestres, microbiota que varia de acordo com o grau de submersão das plantas (PUGH; MULDER, 1971; APINIS et al., 1972 a, b; ELLIS; ELLIS, 1985). Os valores de biomassa e produtividade entre fungos e bactérias no período inicial da decomposição vêm exibindo a típica razão de 9:1 (GESSNER et al., 1997; 2007; KUEHN, 2008). Tal razão é afetada pela especificidade do substrato (folhas, caule ou raízes), localização (ápice ou base da folha e. g.) e idade do fragmento vegetal (broto recém-formado, porções senescentes ou mortas) (KUEHN, 2008). A **Tabela 2** resume boa parte dos estudos que já foram realizados sobre fungos filamentosos associados a macrófitas aquáticas.

Tabela 2. Compilação de alguns estudos já realizados com enfoque na colonização fúngica de macrófitas.

Tema abordado	Grupos principais e outras informações relevantes	Planta	Referência
Produtividade fúngica	Representaram 99% da biomassa microbiana e 91% da produtividade.	<i>Juncus effusus</i>	KUEHN et al., 2000
	Representaram 99% da produtividade microbiana.	<i>Carex walteriana</i>	NEWELL, 1995
Biomassa fúngica	Porções aéreas apresentam maior biomassa do que partes naturalmente submersas	<i>Phragmites australis</i> , <i>Schoenoplectus lacustris</i> e <i>Nuphar lutea</i>	MILLE-LINDBLOM et al., 2006 b
Micorrizas arbusculares			SØNDERGAARD; LAEGAARD, 1977; LATER; CLAYTON; BAGYARAJ, 1984; FARMER, 1985; WIGAND; STEVENSON, 1994; PEDERSEN ET AL., 1995; WETZEL; VAN DER VALK, 1996; CHRISTENSEN; WIGAND, 1998; WIGAND et al., 1998; WHITE; CHARVAT, 1999; BECK-NIELSEN; MADSEN, 2001; NIELSEN et al., 2004; ANDERSEN; ANDERSEN, 2006; REDECKER, 2006; BAAR et al., 2011

Decomposição	<p><i>Aureobasidium</i>, <i>Cladosporium</i>, <i>Alternaria</i> e <i>Phoma</i> são comuns na fase inicial da decomposição. Ascomicetos e basidiomicetos dominaram a decomposição tardia.</p>		<p>PUGH; MULDER, 1971; VAN RYCKEGEM et al., 2007</p>
	<p>As espécies mais comuns: <i>Aphanomyces laevis</i>, <i>Saprolegnia litoralis</i>, <i>Pythium rostratum</i> (fungos zoospóricos) e <i>Acrodictys elaeidicola</i>, <i>Anguillospora longissima</i>, <i>Angulospora aquatica</i>, <i>Lemonniera aquatica</i>, <i>Mirandina corticola</i>, <i>Tetracladium marchalianum</i>, <i>Tetracladium maxiliformis</i> e <i>Trinacrium subtile</i> (fungos conidiais).</p>	<p>22 espécies distintas, dentre elas <i>Elodea canadensis</i>, <i>Hippuris vulgaris f. submersa</i> e <i>Potamogeton crispus</i>, <i>Myriophyllum spicatum</i>, <i>Ceratophyllum demersum</i>, <i>Fontinalis dalarlica</i> e <i>Potamogeton nitens</i></p>	<p>CZECZUGA et al., 2005</p>
<p><i>Phaeosphaeria spartinicola</i>, <i>Mycosphaerella</i> sp., <i>Phaeosphaeria halima</i>, “4 clt” (isolado ambiental sem descrição formal), <i>Buergenerula spartinae</i> e espécies mitospóricas (prováveis formas assexuadas).</p>	<p><i>Spartina alterniflora</i></p>	<p>BUCHAN et al., 2002; 2003; LYONS et al., 2005; KOHLMEYER; VOLKMANN-KOHLMEYER, 2002; NEWELL, 2001 a; 2001 b; NEWELL; PORTER, 2000</p>	
<p>Produção de múltiplos tipos de</p>	<p><i>Spartina alterniflora</i></p>	<p>LYONS et al. 2003</p>	

laccases por ascomicetos

decompositores.

Hierarquia entre espécies de

fungos decompositores no

potencial de degradação e nos

produtos consumidos.

Crescimento das bactérias

depende da atuação primária

dos fungos.

BÄRLOCHER; KENDRICK,
1974; PASCOAL; CÁSSIO, 2008

S. alterniflora, *S.*

Phaeosphaeria spartinicola,

densiflora, *S. foliosa* e

Phaeosphaeria halima e

um híbrido entre as

LYONS et al. 2010

Mycosphaerella sp. cepa 2

espécies *S. alterniflora* e

S. foliosa

Diferenças na composição das

comunidades foram

encontradas entre as

espécies, inclusive entre as

diferentes *Spartina*, mas não

entre diferenças regiões

geográficos.

S. alterniflora, *Spartina*

bakeri, *Spartina patens*,

Phragmites australis e

Juncus roemerianus

BLUM et al.2004

4.5.3 Leveduras

As leveduras são os microrganismos decompositores menos estudados. Sua associação é mais bem documentada em estudos com cactos (STARMER, 1982; STARMER et al., 1982; BARKER et al., 1983; LACHANCE et al., 1988; ROSA et al., 1994; LAZÉRA et al., 1996; STARMER et al., 2003). A ação de organismos (insetos ou pássaros, e.g.) ou de eventuais geadas

facilita a ruptura do tecido dos cactos e a consequente colonização de microrganismos, primariamente bactérias. Compostos voláteis oriundos da fermentação bacteriana parecem atrair moscas, os vetores responsáveis por carrear as leveduras até estes fragmentos. As populações de leveduras podem alcançar densidades entre 10^6 a 10^7 células por grama de tecido vegetal, e são os maiores componentes da microbiota de cactos (LACHANCE et al., 1998).

Rosa e colaboradores (1994) isolaram leveduras associadas ao cacto *Pilosocereus arrabidae*, em ecossistemas de restinga do sudeste do Brasil. As leveduras prevalentes nas porções necrosadas (correspondendo a 80% dos isolados) foram: *Pichia barkeri*, *Candida sonorensis*, *Pichia cactophila*, *Geotrichum* sp., *Myxozyma mucilagina* e *Sporopachydermia* sp. Já as espécies mais frequentes nas flores dos cactos (90% dos isolados) foram: *Pichia* sp. e *Candida domercqii*. Os frutos do cacto exibiram maior heterogeneidade, abrigando *Kloeckera*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium pullulans*, *Pichia* sp., *Candida domercqii-like*, e espécies cactofílicas, especialmente *Clavispora opuntiae*. O grupo de Lachance (1998) avaliou a comunidade de leveduras do cacto *Opuntia*. *Ascomycota* foi o grupo mais comum: *Pichia*, *Candida*, *Hanseniopora*, *Clavispora*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Issatchenkia*, *Sporopachydermia*, *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces* foram isolados desta espécie. *Basidiomycota* foi representado pelas espécies *Cryptococcus albidus*, *Cr. laurentii*, *Rhodotorula graminis*, *R. minuta* e *R. rubra*.

Middelhoven (2004) avaliou as leveduras associadas aos cogumelos *Hericium erinaceus* e *Inonotus tamaricidis*, espécies decompositoras da madeira. *Pichia guillermondii*, *Candida albicans*, *C. saitoana*, *Cryptococcus allantoinivorans* (nova espécie descrita pelo autor), *Kodamaea ohmeri*,

Rhodotorula mucilaginosa, *Trichosporon asahii*, *T. multisporum*, *T. porosum* foram isoladas. Novas espécies de leveduras foram descritas tanto em cogumelos (*Candida cretensis* e *Candida vadensis*) quanto em matéria putrefata (*Blastobotrys robertii* e *Candida scorzettiae*) (MIDDELHOVEN; KURTZMAN, 2007).

Middelhoven (2006) descreveu *Cryptococcus fagi*, uma nova espécie de levedura, ao analisar detritos vegetais de floresta. Recentemente também foram descritas espécies de leveduras isoladas de detritos de áreas de mangue da Tailândia: *Candida chanthaburiensis*, *Candida kungkrabaensis*, e *Candida suratensis* (LIMTONG; YONGMANITICHAI, 2010); e *Candida saraburiensis* e *Candida prachuapensis* (NITYION et al., 2011).

A madeira em decomposição parece ser um habitat natural para as espécies de importância médica *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e *Cryptococcus neoformans* var. *gatii* (LAZÉRA et al., 1996; LAZÉRA et al., 1998). *Cryptococcus laurentii*, outro patógeno oportunista, também tem sido isolado destes substratos (MUSSA et al., 2000).

Leveduras saprófitas foram isoladas de folhas (amieiro, carvalho e pinheiro) coletadas em dois rios portugueses, um poluído e outro não, por cerca de 100 dias. Verificaram-se a presença de 26 gêneros e 72 espécies de leveduras. As leveduras basidiomicéticas foram maioria, representando respectivamente 78%, 82% e 85% do total dos isolados obtidos das amostras de amieiro, carvalho e pinheiro. Já as leveduras ascomicéticas, apesar de menos abundantes, foram mais diversas. *Aureobasidium pullulans*, algumas espécies de *Candida*, *Metschnikowia bicuspidata* e *Pichia anomala* foram dominantes na decomposição inicial (até 7^o dia). *Debaryomyces hansenii*, *D.*

occidentalis, *Lipomyces tetrasporus*, *Williopsis saturnus* e *Wickerhamiella domercqiae* dominaram o período intermediário (entre os dias 28 e 56). Somente algumas espécies de *Basidiomycota* foram persistentes por três ou mais períodos: *Cryptococcus laurentii*, *Cr. albidus*, *Rhodotorula colostri* e *Rh. glutinis* para o amieiro; *Cr. albidus*, *Cr. laurentii*, *Rh. colostri*, *Sporobolomyces roseus* para o carvalho; e *Cr. laurentii*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Leucosporidium scottii*, *Trichosporon cutaneum*, *Rh. colostri* e *Cr. albidus* para o eucalipto.

No Brasil, foram detectadas 71 espécies de leveduras isoladas de amostras de frutas, moscas *Drosophila*, cogumelos e exsudatos de árvores de duas estações do Parque do Rio Doce/MG. *Candida natalensis*, *C. railenensis*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia guilliermondii*, *P. kluyveri*, *C. sorboxylosa* e *P. membranifaciens* foram espécies associadas às moscas. *Kloeckera*, *Pichia* e *Candida* foram isolados dos frutos. As espécies associadas aos cogumelos foram *Aureobasidium pullulans*, *Candida papsilosis*, *Candida* sp. 1, *Cryptococcus humiculus*, *Cr. laurentii*, *Cr. yarrowii* e *P. membranifaciens*. As amostras de exsudatos foram compostas principalmente por *Cr. humicolous*, *P. membranifaciens* e *P. membranifaciens-like*. Isolaram-se duas espécies ainda não descritas de *Geotrichum* e *Metschnikowia* (PIMENTA et al., 2009).

Tratando-se de ambientes aquáticos, *Candida* é o ascomiceto mais isolado (MEDEIROS, 2005). Porém as leveduras ascomicéticas são pouco frequentes nestes locais, o que pode estar relacionado com a baixa resistência destas leveduras a temperaturas mais elevadas (SOARES et al., 1997).

Poucos trabalhos brasileiros já foram feitos em ecossistemas costeiros ou aquáticos. Análises quali e quantitativas foram conduzidas por Faraco e

Faraco (1960), em água marinha de Florianópolis/SC, e por Queiroz e seu grupo (1972), em algas marinhas de Recife/PE.

Medeiros e colaboradores (2008) realizaram um trabalho em ambientes de água doce da região sudeste do Brasil a fim de avaliar a diversidade e a suscetibilidade da comunidade de leveduras a antibióticos. Isolaram-se 134 espécies de amostra de água e sedimento, sendo as espécies de *Candida* as mais representativas, incluindo a presença de patógenos como *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*. Loureiro e colegas (2005) encontraram *Candida catenulata*, *C. fenica*, *C. sake* e *Rhodotorula mucilaginosa* como as espécies mais comuns das praias de Olinda/PE.

Sousa (2010) utilizou métodos bioquímicos para avaliar a diversidade de leveduras associadas à decomposição de folhas de *Miconia* sp. no Rio Água Suja/TO. Ao longo do processo de decomposição foram obtidos 58 isolados, pertencentes a 36 espécies de 16 gêneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Debaryomyces*, *Fibulobasidium*, *Itersonilia*, *Kockovaella*, *Lipomyces*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Stephanoascus*, *Trichosporon*, *Trichosporonoides* e *Zygoascus*. Os gêneros com maior número de espécies foram *Candida* (12), *Cryptococcus* (8), *Rhodotorula* (2) e *Trichosporon* (2), tendo o restante dos gêneros apresentado somente uma única espécie. A maior riqueza de espécies (20) foi verificada no período chuvoso, após 60 dias de incubação, embora no período seco as contagens populacionais e a frequência das espécies tenham sido maiores.

Silveira (2012) isolou leveduras de amostras de água do estuário da Lagoa dos Patos e da Praia do Cassino/RS, sendo estes os principais microrganismos do ambiente de praia. *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus*

albidus, *Issatchenkia orientalis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rh. minuta* e *Yarrowia lipolitica* foram encontradas.

4.6.1 Interações entre os microrganismos decompositores

Interações entre microrganismos decompositores (imigração, colonização, sucessão, sinergismo, antagonismo) são crescente objeto de estudos tanto *in situ* quanto em microcosmos de laboratório, representando a forma mais completa de analisar a degradação biótica das plantas e o incremento de energia derivada do carbono vegetal e microbiano nos ecossistemas. Tais interações, sejam elas positivas ou negativas, influenciam a distribuição de ambos os grupos.

Os imigrantes mais bem sucedidos são os esporos de fungos, especialmente em folhas novas. Uma maior quantidade de bactérias também é observada nas folhas recém-geradas em detrimento das folhas senescentes. Avaliando-se diferenças na interação entre os grupos, observou-se que os fungos dobraram o tamanho de suas populações cerca de dez vezes mais rápido que as bactérias, o que justifica a dominância destes microrganismos desde os estágios iniciais de decomposição. Apesar de não ter bem esclarecidos os mecanismos que levaram a tal interação, os resultados deste trabalho apontaram sinergismo entre ambos os grupos (BENGTSSON et al., 1992).

Outro trabalho abordou estas interações durante a colonização de detritos foliares em lagos, mas verificou antagonismo entre os grupos: os fungos foram abundantes quando as bactérias se apresentaram em baixo número, e vice e versa (DENWARD; TRANVIK, 1999). Resultados similares

foram encontrados entre actinomicetos e duas espécies de fungos aquáticos quando estes eram co-cultivados simultaneamente. Porém, quando co-cultivados com um intervalo de dois dias entre um inóculo e outro, a combinação entre os microrganismos demonstrou as melhores taxas de decomposição, assim como os melhores níveis de atividade das enzimas extracelulares (WOHL; MCARTHUR, 2001). Møller e colaboradores (1999) apontaram a competição por fontes de carbono como o principal agente causal do antagonismo entre bactérias e fungos em serrapilheira de faia.

Relações entre bactérias e fungos foram avaliadas durante a decomposição *in vitro* de *Phragmites australis*. Após três meses de experimentos, a biomassa fúngica acumulada nos cultivos sem bactérias foi cerca de 12 vezes maior do que nos co-cultivos. Já a representatividade das bactérias em cultivos exclusivos foi o dobro dos co-cultivos. O metabolismo do carbono das plantas não variou muito conforme a presença/ausência de um dos grupos. Uma vez que fungos e bactérias são capazes de afetar o crescimento um do outro mesmo sem esgotamento das fontes nutricionais disponíveis, sugere-se que os dois maiores grupos de microrganismos heterotróficos atuem em antagonismo bilateral durante a decomposição de macrófitas aquáticas (MILLE-LINDBLOM; TRANVIK, 2003).

Já outro trabalho que também analisou a colonização de *Phragmites australis* detectou maior biomassa bacteriana em folhas sem pré-tratamento e em folhas inoculadas com fungos, sugerindo-se que estes microrganismos favoreceram o crescimento bacteriano. A biomassa fúngica não variou significativamente com o tempo analisado, mas foi influenciada pelos diferentes tratamentos aplicados (colonização das folhas esterilizadas, não esterilizadas,

pré-inoculada com bactérias, pré-inoculada com fungos, pré-inoculada com ambos). A atividade enzimática dos fungos foi maior quando as bactérias estiveram presentes. Ambos os grupos atuaram sinergicamente na colonização e degradação do substrato (ROMANÍ et al., 2006).

O comportamento entre fungos e bactérias também foi observado durante a decomposição de *Juncus effusus*. Apesar dos fungos serem bem mais representativos do que as bactérias (cerca de 20 vezes mais), ambos os grupos apresentaram redução abrupta na biomassa até os 50 dias, sendo marcados por redução branda entre os 50 - 200 dias (bactérias) e 120 - 200 dias (fungos), seguida por uma fase de aumento da biomassa até os 268 dias de incubação dos detritos no ambiente. A biomassa fúngica correlacionou positivamente com o tamanho do detrito, enquanto tanto a biomassa quanto a produtividade bacteriana correlacionaram negativamente, indicando que as bactérias assumem um papel mais significativo nas partículas menores, retrabalhadas por outros organismos (principalmente fungos) (KUEHN et al., 2000).

Biddanda e colaboradores (1994), através de medidas de respiração, também observaram um aumento na biomassa microbiana conforme a redução do tamanho das partículas durante a decomposição. Constatou-se, na maioria dos casos, um aumento na concentração de hifas e esporos, principalmente em *Spartina alterniflora*, a partir da segunda semana do experimento, período coincidente com o predomínio do material mais refratário. Bactérias removem ativamente compostos orgânicos dissolvidos, sejam eles de baixo ou alto peso molecular. Contrariamente, os fungos promovem o acúmulo destes compostos, e são suprimidos pelas bactérias (FISHER et al., 2006).

A comunidade microbiana das folhas de carvalho foi acompanhada e revelou que os fungos endófitos representaram a maioria dos microrganismos presentes nas folhas, antes mesmo de sua abscisão (SNAJDR et al. 2010). Ou seja, a microbiota colonizadora dos detritos é limitada pela competição com os fungos pré-estabelecidos na planta (MILLE-LINDBLOM; TRANVIK, 2003; FOLMAN et al., 2008). Os compostos solúveis em água permanecem indisponíveis às bactérias até que a parede celular das células vegetais seja rompida pelos fungos filamentosos, contribuindo para que os mesmos sejam dominantes na etapa inicial da decomposição (ROMANI et al., 2006; VALASKOV et al., 2009).

Porém, outros trabalhos em ambientes de floresta revelaram que os fungos nem sempre são os organismos dominantes da fase inicial: os detritos de *Quercus borealis* e *Fagus crenata* abrigaram a maior biomassa de fungos após 12 e 6 meses de decomposição, respectivamente (OSONO; TAKEDA, 2001; SINSABAUGH et al., 2002). Tais organismos foram os decompositores dominantes em todos os tipos de plantas avaliadas pelo método de respiração substrato induzida, aparentando ter papel substancial em todo o processo (NEELY et al., 1991).

4.6 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS DECOMPOSITORES

A diversidade funcional microbiana é constantemente incrementada pelo desenvolvimento, acúmulo e supressão de remarcáveis características fisiológicas, o que torna os microrganismos os principais reservatórios do potencial genético de determinados ambientes. Os fungos aquáticos, e.g.,

estão adaptados a transformar bioquimicamente compostos exógenos oriundos de problemas de contaminação por descarga de efluentes domésticos ou industriais em rios e lagos, afetando deste modo a mobilidade de elementos tóxicos e a vida de outros organismos, o que os torna importantes agentes ecológicos na teia alimentar destes ambientes (WURZBACHER et al., 2010).

Os fungos têm papel fundamental em muitos processos biogeoquímicos, e. g. transformações orgânicas e inorgânicas e ciclagem de elementos, transformações minerais, interações com argila e metais (GALL et al. 1994; VENRECCHIA, 2000; GADD, 2006; KOLO et al., 2007). Fungos de ecossistemas aquáticos possuem diversas capacidades enzimáticas (ZEMEK et al., 1985; ROSA; GABOR, 2006) incluindo a habilidade de degradar polímeros naturais e antropogênicos (e.g. ABDULLAH; TAJ-ALDEEN, 1989).

Os metabólitos secundários dos fungos *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* são amplamente utilizados na indústria (ADRIO; DEMAIN, 2003). Os “fungos da podridão branca” produzem enzimas lignolíticas que vêm recebendo as mais variadas aplicações: branqueamento do papel, degradação/mineralização de compostos tóxicos, biorremediação de solos contaminados, biocatálise de flavorizantes naturais e tratamento (clareamento) de efluentes em geral (PÉREZ et al., 2002).

As leveduras são reconhecidas principalmente pela atividade de fermentação na indústria do pão, da cerveja, do vinho, e de laticínios. Mas estes microrganismos também têm sido empregados na produção de solventes, antibióticos, enzimas, vitaminas, aminoácidos, polímeros e muitos outros compostos (DEMAIN, 1999). Recentemente, a produção das mais diversas proteínas heterólogas recombinantes vem sendo desenvolvida em

leveduras - representam um sistema bem mais simples do que os fungos filamentosos (ADRIO; DEMAIN, 2003).

Saccharomyces cerevisiae é considerada o hospedeiro mais seguro para a produção de proteínas na indústria farmacêutica: alcança altas densidades celulares rapidamente, pode secretar enzimas extracelulares no meio, e é o eucarioto mais bem conhecido geneticamente (ROMANOS et al., 1992). *Pichia pastoris* também tem sido extensivamente utilizada em sistemas de expressão (HIGGINS; CREGG, 1998; ROSENFELD, 1999). Até mesmo genes humanos vêm sendo clonados em células de leveduras: hemoglobina, interferons e fatores de crescimento humanos. O processo comercialmente mais importante que utiliza leveduras é a produção de antígenos do vírus da hepatite B, aplicados em vacinas contra o vírus (ADRIO; DEMAIN, 2003).

Os primeiros estudos sobre o papel das enzimas nos ambientes aquáticos focaram na degradação microbiana das proteínas dissolvidas no mar (HOLLIBAUGH; AZAM, 1983), nas ectoenzimas de águas salobras (HOPPE, 1983) e na degradação enzimática em águas eutrofizadas (CHRÓST et al., 1986; CUNHA-SANTINO et al., 2008). A atividade das enzimas envolvidas na decomposição pode ser mensurada diretamente, a partir do próprio substrato (e. g. SCIESSERE et al., 2011), ou indiretamente, através de testes enzimáticos aplicados aos microrganismos previamente isolados (e. g. SNAJDR et al., 2010).

A diversidade funcional dos fungos decompositores ainda é pouco conhecida em ambientes aquáticos. Uma revisão sobre enzimas microbianas marinhas (ZHANG; KIM, 2010) destacou a produção de algumas leveduras: protease alcalina de *Aureobasidium pullulans* (CHI et al., 2007); lipases de

Candida intermedia, *Pichia guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Lodderomyces elongisporus*, *Candida quercitrusa*, *Candia rugosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Aureobasidium pullulans* (WANG et al., 2007); e amilases de *Arxula adenivorans*, *Lipomyces*, *Saccharomycopsis*, *Schwanniomyces*, *Candida japonica*, *Filobasidium capsuligenum* (GUPTA et al., 2003) e *Aureobasidium pullulans* (LI et al., 2007).

Já foram conduzidos alguns trabalhos sobre a atividade decompositora de fungos em macrófitas aquáticas (MYERS et al., 1975; GESSNER, 1980; TORZILLI, 1982; BENNER et al., 1984; TORZILLI; ANDRYKOVITCH, 1986; BERGBAUER et al., 1992; ABDEL-RAHEEM; SHEARER, 2002; SCHULZ; THORMANN, 2005; ROMANÍ et al., 2006). Myers e colaboradores (1975) verificaram a atividade de β -glucosidase, dentre outras enzimas, na levedura *Pichia spartinae*.

Gessner (1980) avaliou capacidade enzimática de 20 fungos filamentosos isolados de *Spartina alterniflora*, que demonstraram degradar celulose, celobiose, lipídeos, pectina, amido, ácido tanínico e xilana. As células desta espécie de macrófita foram utilizadas para avaliar a atividade enzimática de *Pleospora pelagica*, *Pleospora vagans*, *Phaeosphaeria typharum*, atestando-se a atividade de α -L-arabinosidase, α -D-galactosidase, β -D-galactosidase, β -D-glucosidase, β -D-xylosidase, celulase, pectinase, e xilanase (TORZILLI, 1982).

Frações lignocelulósicas, celulósicas e hemicelulósicas dos tecidos de *S. alterniflora* foram degradadas por fungos a taxas entre 16 e 40% (TORZILLI; ANDRYKOVITCH, 1986). Utilizando-se a técnica de marcação por ^{14}C , aferiu-se a participação de fungos aquáticos na mineralização de compostos

lignocelulósicos de *S. alterniflora* (BENNER et al., 1984) e *Carex walteriana* (BERGBAUER et al., 1992). Trinta espécies de ascomicetos isolados de substratos em decomposição de águas doces tiveram a habilidade de produzir diferentes enzimas extracelulares (amilase, endoglucanase, endoxilânase, β -glucosidase, laccase, lipase, pectinase, peroxidase, poli galacturonase, polifenol oxidase, protease, tirosinase e xilosidase) (ABDEL-RAHEEM; SHEARER, 2002).

Schulz e Thormann (2005) analisaram a diversidade e a atividade enzimática de fungos isolados de *Typha latifolia* de áreas úmidas do Canadá. Identificaram-se 45 taxa diferentes, sendo 26 ascomicetos, 5 basidiomicetos e 14 taxa anamórficos (maioria com afinidade ascomicética). A habilidade enzimática de 33 taxa de fungos foi testada, sendo os substratos mais comumente degradados a celulose e a gelatina. Romaní e equipe (2006) verificaram que os fungos inibiram a atividade enzimática das bactérias ao degradar os tecidos de *Phragmites australis* e destacaram-se na produção de β -glucosidase, β -xilosidase, celobiohidrolase, β -Nacetilglucosaminidase, fosfatase e fenol oxidase.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ÁREA DE ESTUDO

A Laguna dos Patos é a maior laguna costeira estrangulada (~10.000 km²) do mundo, localizada ao sul da planície costeira brasileira (32° 10' S e 52° 15' W). A laguna recebe cargas de água doce dos rios da parte norte da planície costeira do Rio Grande do Sul e dos rios afluentes da Lagoa Mirim, representando deste modo um escoadouro natural da bacia hidrográfica (~2.000 km²) para o oceano (MÖLLER; FERNANDES, 2010) (**Figura 1**).

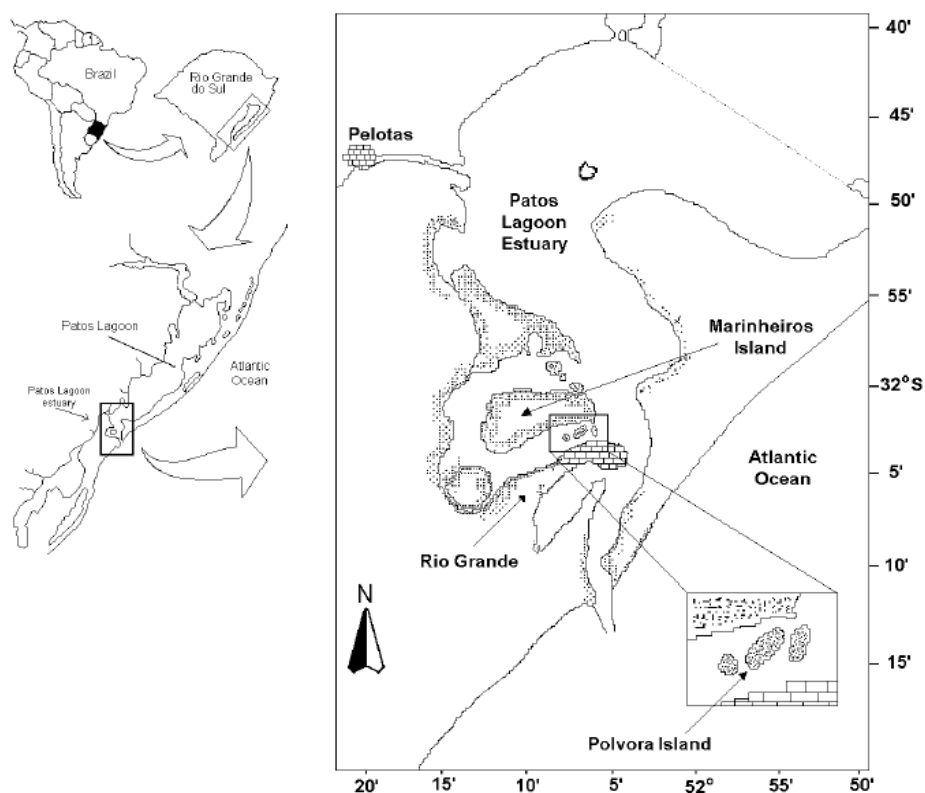


Figura 1. Localização da Lagoa dos Patos e zona estuarina, com destaque para a Ilha da Pólvora, área do presente estudo. **Fonte:** CUNHA e colaboradores (2005).

A zona estuarina da Laguna é formada por cerca de 170 km² de áreas rasas, com profundidade inferior a 1,5 m, as quais fornecem condições propícias ao estabelecimento e desenvolvimento de marismas, nas quais predominam fanerógamas enraizadas e macroalgas bentônicas (COPERTINO; SEELIGER, 2010). As marismas são predominantes nas regiões costeiras brasileiras ao sul da latitude 29°S (Laguna/SC), ocupando 7.375 ha da costa do Rio Grande do Sul e principalmente as margens e ilhas do estuário da Lagoa dos Patos/RS (6.837 ha – 92,7% da área total) (COSTA; DAVY, 1992; COIMBRA; COSTA, 2006). O presente estudo deu-se numa marisma de uma destas ilhas, a Ilha da Pólvora (**Figura 1**).



Figura 2. Manchas de marismas da Ilha da Pólvora.

A Ilha da Pólvora (32°01'S; 52°06'W) possui uma superfície de 45 ha, quase totalmente coberta por marismas (**Figura 2**). A Ilha foi área militar durante 134 anos e devido ao isolamento imposto pelos militares, tem suas marismas entre as mais preservadas do estuário, mesmo localizando-se a menos de 500 m do centro do município de Rio Grande. Atualmente sob tutela da FURG, é uma área dedicada à preservação, pesquisa e educação ambiental, e abriga um Eco-museu aberto ao público.

As manchas de marismas do estuário da Lagoa dos Patos apresentam áreas entre 0,9 e 39,8 km² e ocupam uma área total de aproximadamente 70 km² das zonas intermareais. Canais e piscinas de maré podem representar até 20% das áreas individuais de marismas. Aproximadamente 120 km² das áreas rasa entre 0,3 e 1,5 m de profundidade são recobertas por pradarias submersas de *Ruppia maritima* (COSTA; SEELIGER, 1989; SILVA, 1995). As macrófitas aquáticas dominantes destes locais são *Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora* e *Scirpus maritimus*. As espécies de peixes e crustáceos de interesse comercial beneficiadas pelas pradarias submersas e áreas aquáticas das marismas juntas representam até 65% da média anual de captura (21.500 toneladas) do estuário (COSTA et. al., 1997).

Aterros e estradas ocupam de 3,0 a 14,9% da superfícies das marismas da Lagoa dos Patos, resultando em perda de suas funções para o estuário. As marismas e pradarias do estuário do local diferem amplamente em tamanho, forma e organização espacial, que resultam em unidades espacialmente distintas, com diferentes valores funcionais. Os atributos espaciais que mais agregam valor a estes ambientes são disponibilidade de

habitats aquáticos, área total e persistência temporal (somente para pradarias) (COSTA et al. 1997).

Os principais agentes que influenciam o clima da região é o anticiclone do Atlântico Sul e a Convergência Subtropical, o encontro entre as águas das correntes das Malvinas e do Brasil. Os ventos do quadrante NE são predominantes na maior parte do tempo, estando os ventos de S associados à passagem de frentes polares no inverno (STECH; LORENZETTI, 1992; TOMAZELLI, 1993). A sazonalidade das chuvas e da descarga de águas continentais no local está associada a passagens do *El Niño* - Oscilação do Pacífico Sul (DEPETRIS et al., 1996; VÖRÖSMARTY et al., 1996), enquanto anos de *La Niña* são marcados por fortes estiagens (MARENGO, 2007). Estes elementos provocam profundas modificações no regime hidrológico, na dinâmica dos sedimentos e nas condições físico-químicas da água, no transporte e na migração dos organismos, alterando deste modo toda a estrutura do estuário e adjacências (SEELIGER, 2004).

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Realizou-se um experimento de decomposição das plantas através do método de "*litter bags*". Coletaram-se plantas inteiras (hastes, folhas e rizomas) das macrófitas *Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora* e *Scirpus maritimus*, espécies escolhidas em virtude da abundância no local de estudo (**Figuras 3 e 4**).

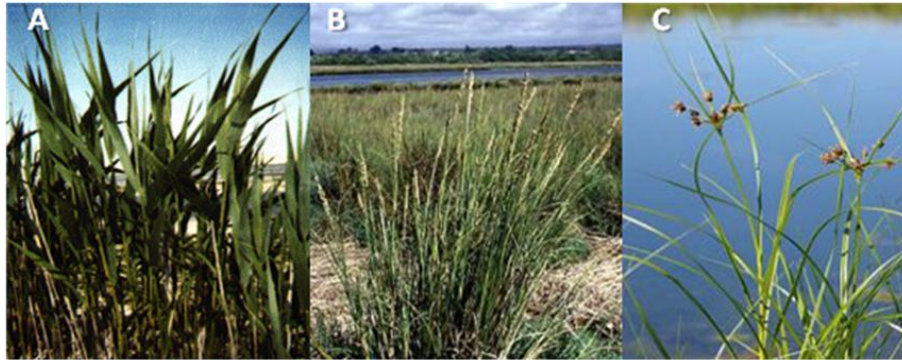


Figura 3. Macrófitas escolhidas para realização do ensaio de “*litter bags*”. A. *Spartina alterniflora*. B. *Spartina densiflora*. C. *Scirpus maritimus*.

Fontes: Wikipedia.



Figura 4. Imagem aérea da Ilha da Pólvora com a localização do ponto de coleta das amostras de macrófitas aquáticas (círculo). **Fonte:** <http://mikrus.com.br>.

O material foi encaminhado ao laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e Microrganismos Marinhos da FURG (Universidade Federal do Rio Grande),

picotado em fragmentos reduzidos e desidratado em estufa a 60°C até atingir peso constante para eliminar os compostos lábeis dos tecidos vegetais. Porções de 5 g de folha (massa seca) foram pesadas e acondicionadas em *litter bags* de malha fina (malha: 1 mm; dimensões: 15 x 12 cm). Os sacos foram selados, numerados, identificados e depositados próximo ao banco original de macrófitas onde cada espécie foi coletada (**Figura 5**).



Figura 5. Localização dos bancos de macrófitas, pontos nos quais foram depositados os “*litter bags*” de *Scirpus maritimus* (1), *Spartina alterniflora* (2) e *Spartina densiflora* (3).

Para cada uma das espécies selecionadas e cada tempo de coleta, foram depositados 3 sacos para o cálculo do decaimento das amostras e 3 sacos para o isolamento das leveduras. Logo, para cada um dos três bancos de macrófitas foram incubados 30 “*litter bags*”, que foram retirados do ambiente

nos tempos 7, 14, 40, 100, e 220 dias de incubação (total de 90 “*litter bags*”)
(Figura 6).



Figura 6. Demonstração da disposição dos “*litter bags*” contendo os detritos das macrófitas aquáticas a serem coletados em tempos determinados.

Fonte: <http://ecoplexity.org>.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE E DO SUBSTRATO

Coletaram-se dados ambientais para caracterizar as condições sob as quais a decomposição das plantas ocorreu. Médias mensais da temperatura do ar e da água, da salinidade e valores acumulados de precipitação foram obtidos através da Estação Meteorológica Convencional de Rio Grande, que é operada pelo Laboratório de Meteorologia da FURG em convênio com o Oitavo Distrito do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

O substrato foi caracterizado conforme a porcentagem de nitrogênio orgânico total das amostras. O teor deste elemento varia de acordo com a espécie, variedade, parte, estado nutricional e integridade da planta. A análise foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia do Solo da Faculdade de Agronomia da UFRGS, através do método proposto por Tedesco e colaboradores (1995).

5.4 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE DECOMPOSIÇÃO DAS MACRÓFITAS

A decomposição das amostras foi avaliada através dos valores de perda de massa dos detritos dos “*litter bags*”: peso inicial (5 g) menos o peso aferido no tempo analisado. As taxas de decomposição de cada período foram calculadas conforme a média entre os valores de perda de massa de três “*litter bags*”.

5.5 CONTAGEM E ISOLAMENTO DE LEVEDURAS

Uma alíquota de 3g dos detritos vegetais foi disposta em frascos do tipo Erlenmeyer contendo 30 mL de Tween 20 a 0.5%. A mistura foi agitada a temperatura ambiente a 200 RPM por 30 min. Volumes de 0,1 mL das diluições decimais das amostras foram espalhados em placas com meio ágar YM acidificado (1% glicose, 0.3% extrato de malte, 0.3% extrato de levedura, 0.5% peptona, 2% ágar, acidificado ao pH 4.0 e suplementado com 0.04% de cloranfenicol e 0.01% de bifenila). Após a incubação dos cultivos a 20-25°C por até 7 dias, o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foi contabilizado. As colônias foram agrupadas por tipo morfológico de acordo com os seguintes caracteres: forma, cor, tamanho, margem, elevação superfície, brilho e consistência. As representantes de diferentes tipos morfológicos foram duplamente purificadas pela técnica do esgotamento em ágar YEPG (2% glicose, 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 2% ágar).

5.6 CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados de leveduras obtidos foram mantidos em ágar YEPG inclinado, a 4°C, cobertos com uma camada de óleo mineral estéril.

5.7 TIPIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

As leveduras foram testadas quanto à capacidade de degradar ureia do meio de cultura e reagir à reação do corante DBB (sal de “*Diazonium Blue B*”). O protocolo de Hagler e Ahearn (1981) foi utilizado, com algumas pequenas adaptações. O corante fucsina ácida foi utilizado como indicador do consumo de ureia no meio, que passou da cor rosa à cor branca nos testes positivos (**Figura 7**).

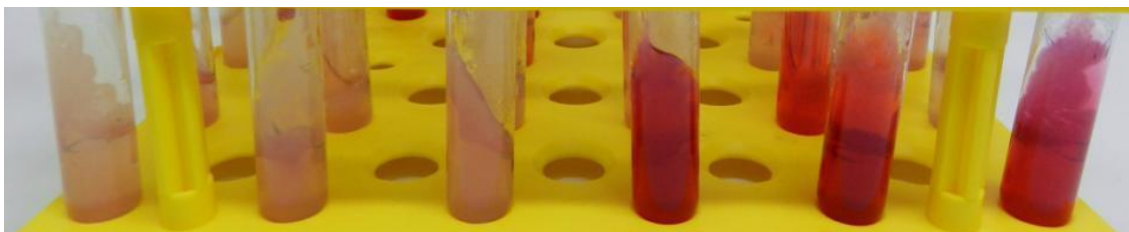


Figura 7. Tubos contendo o meio teste da urease. Os tubos com coloração mais clara, à esquerda, representam os resultados positivos para a degradação da ureia do meio. Os tubos com coloração rosa intenso, à direita, representam os resultados negativos.

A cor das colônias de leveduras DBB positivas (com afinidade basidiomicética) passa de branco a rosa-violáceo em contato com o reagente DBB (**Figura 8**). O mecanismo da reação de DBB é desconhecido, mas Van der Walt e Hopsu-Havu (1976) sugeriram que a formação da cor na reação envolva a degradação de intermediários da parede celular das leveduras basidiomicéticas que contém triptofano e grupamentos cetona.

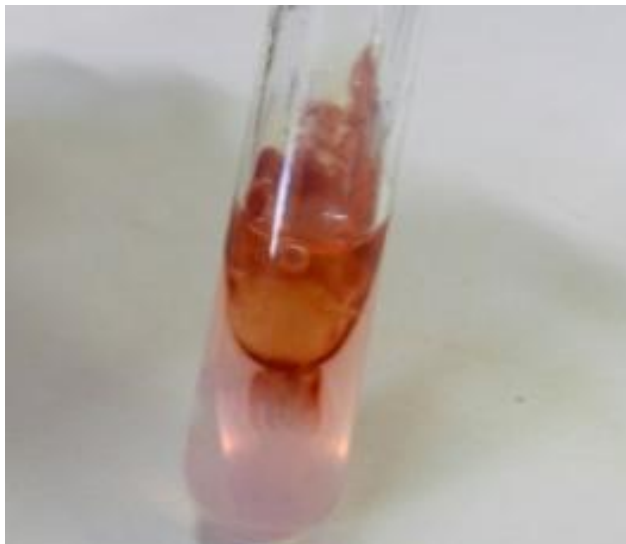


Figura 8. Cor da reação positiva ao corante DBB. As colônias eram originalmente brancas.

5.8 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

As leveduras foram identificadas por meio de métodos moleculares, passando pelos seguintes passos: seleção de representantes de cada grupo morfológico, extração do DNA genômico total dos isolados, amplificação de genes ribossômicos com oligonucleotídeos específicos e posterior sequenciamento para fins de identificação em nível de espécie. As regiões do DNA ribossômico (rDNA) avaliadas foram: região D1/D2 da subunidade maior (oligonucleotídeos iniciadores NL1 e NL4) e região espaçadora interna (oligonucleotídeos iniciadores ITS4 e ITS5).

5.8.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA genômico, os isolados foram previamente cultivados em meio Ágar YEPG (2% glicose, 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 2% ágar) e incubados por até 4 dias a 23-25°C. Algumas colônias selecionadas foram inoculadas em tubos contendo 0,5 mL de tampão de lise

celular (0,15 M NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 2% SDS, pH 8), incubados por uma hora a 65°C. Após, foram adicionados 0,2mL de Acetato de Potássio 5M (pH 4.8) em cada tubo, a solução foi ressuspensa por no mínimo 30 segundos e as amostras foram acondicionadas em banho de gelo por 30 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14000rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. A etapa de centrifugação foi repetida para eliminar impurezas, e o sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo. O sobrenadante foi purificado com 1 volume de isopropanol gelado. Os tubos foram gentilmente agitados por 5 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugados a 14000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 0,5 mL de etanol a 70% conservado a -20 °C em cada tubo e as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente. As amostras foram diluídas em 50µL de TE (TRIS-EDTA, pH 7,4) e tratadas com RNase. A quantidade e a qualidade do DNA obtido foram verificadas através de eletroforese de DNA em gel de agarose 0,8-1%.

5.8.2 Sequenciamento da região D1/D2 do LSU rDNA e ITS

Para amplificação da região D1/D2 utilizaram-se os oligonucleotídeos iniciadores NL1 (5'- GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG -3') e NL4 (5'- GGT CCG TGT TTC AAG ACG G -3') gerando fragmentos com tamanho aproximado de 600 pares de base (LACHANCE et al., 1999). O programa de amplificação teve desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min, com uma extensão final de 72°C por 10 min.

Para amplificação da região ITS, que compreende os espaçadores intergênicos ITS1 e ITS2 e o gene do rRNA 5.8S, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3') e ITS 5 (5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3'), gerando fragmentos com tamanho aproximado de 700 pares de base (WHITE et al., 1990). O programa de amplificação teve desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 95°C por 45s, 56°C ou 62°C por 30s (temperatura de anelamento variável entre as amostras) e 72°C por 1 min, com uma extensão final de 72°C por 7 min.

Os amplicons foram purificados em gel de agarose 1.8% utilizando o kit de purificação Invisorb Fragment Clean Up (250) (Invitek), conforme as instruções do manual. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria, num comprimento de onda de 260 nm, e concentradas a 60 ng/μL para a reação de sequenciamento. O sistema utilizado no sequenciamento das amostras foi o ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As sequências foram obtidas por meio do programa STADEN Package (STADEN et al. 2000), alinhadas por meio do programa MEGA versão 5.0 (TAMURA et al. 2011) e analisadas no programa BLAST Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) (ALTSCHUL et al. 1997), disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

5.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS ISOLADOS

As leveduras isoladas foram testadas quanto à capacidade de produzir lipases (degradar tributirina e tween 80), proteases (degradar caseína e gelatina) e polissacarases (degradar amido e CMC). Os isolados foram

cultivados em ágar YEPG a 20-25°C por até 72h e inoculados nos meios teste por picada. A atividade enzimática dos isolados sob os substratos foi detectada e quantificada após 10 dias de incubação a 20-25°C, em triplicata, pelo método de difusão em ágar modificado de Hankin e Anagnostakis (1975). Tal atividade é expressa pelo Índice Enzimático (IE), calculado da seguinte maneira:

$$\mathbf{IE} = \frac{\mathbf{Diâmetro\ maior\ médio\ (colônia\ +\ halo/2)}}{\mathbf{Diâmetro\ menor\ médio\ (colônia/2)}}$$

Onde “colônia + halo” e “colônia” representam a soma dos diâmetros horizontal e vertical de cada compartimento. Os valores menores de IE representam as maiores diferenças de tamanho entre os diâmetros, significando maior atividade enzimática.

5.9.1 Degradação de tributirina

O meio teste para degradação da tributirina foi composto por: 1% Tributirina líquida, 0,5% Peptona, 0,3% Extrato de levedura, 2% Ágar (ATLAS; PARKS, 1993). O resultado positivo se dá com a formação de um halo transparente em torno das colônias de leveduras produtoras (**Figura 9**).

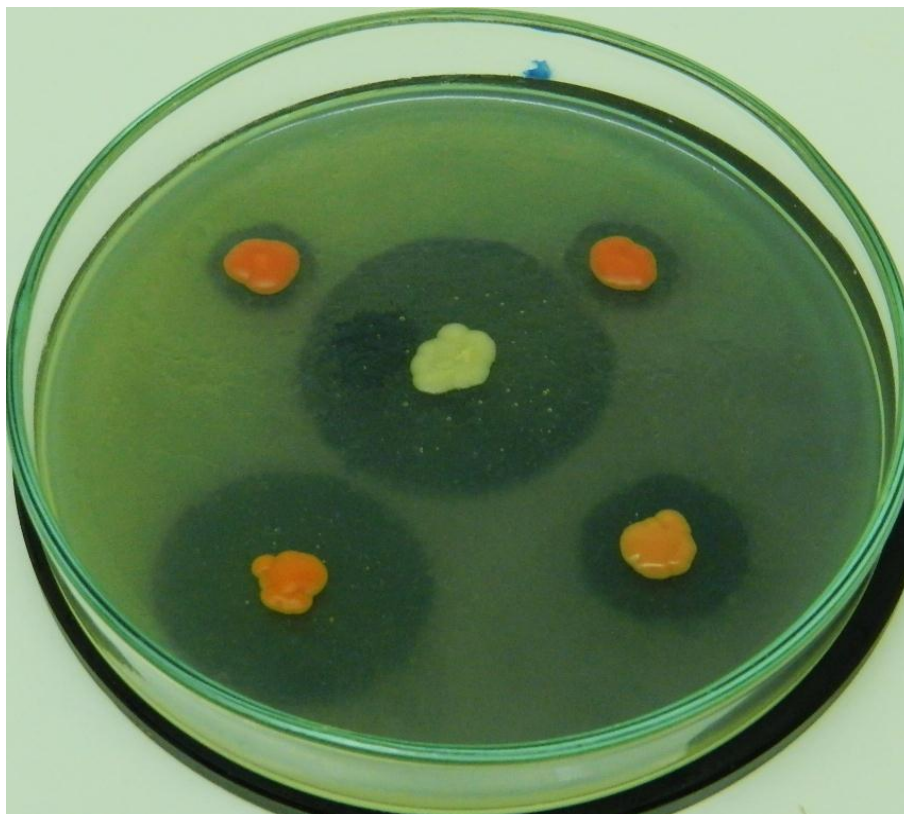


Figura 9. Cultivo de leveduras por picada em meio contendo tributirina. Observa-se um halo translúcido de degradação do substrato ao redor dos cinco isolados, resultado positivo para produção de lipases.

5.9.2 Degradação de esterases

O meio teste para degradação da tributirina foi composto por: 2,5% Tween 80, 1% Peptona, 0,5% Cloreto de sódio, 0,1% Glicose, 0,01% Cloreto de cálcio, 2 % Ágar (SLIFKIN, 2000). O Tween 80 é um lipídeo de cadeia longa que quando consumido libera ácidos graxos menores, provocando uma acidificação do pH do meio de cultura. Quando a enzima produzida provocar apenas a liberação parcial de ácidos graxos do meio, a redução do pH provocará a precipitação do carbonato de cálcio ao redor das colônias, formando um halo esbranquiçado. Quando, ao invés disto, se formar um

precipitado mais claro, terá ocorrido a hidrólise total dos ácidos graxos do meio de cultura ao redor da colônia (**Figura 10**).

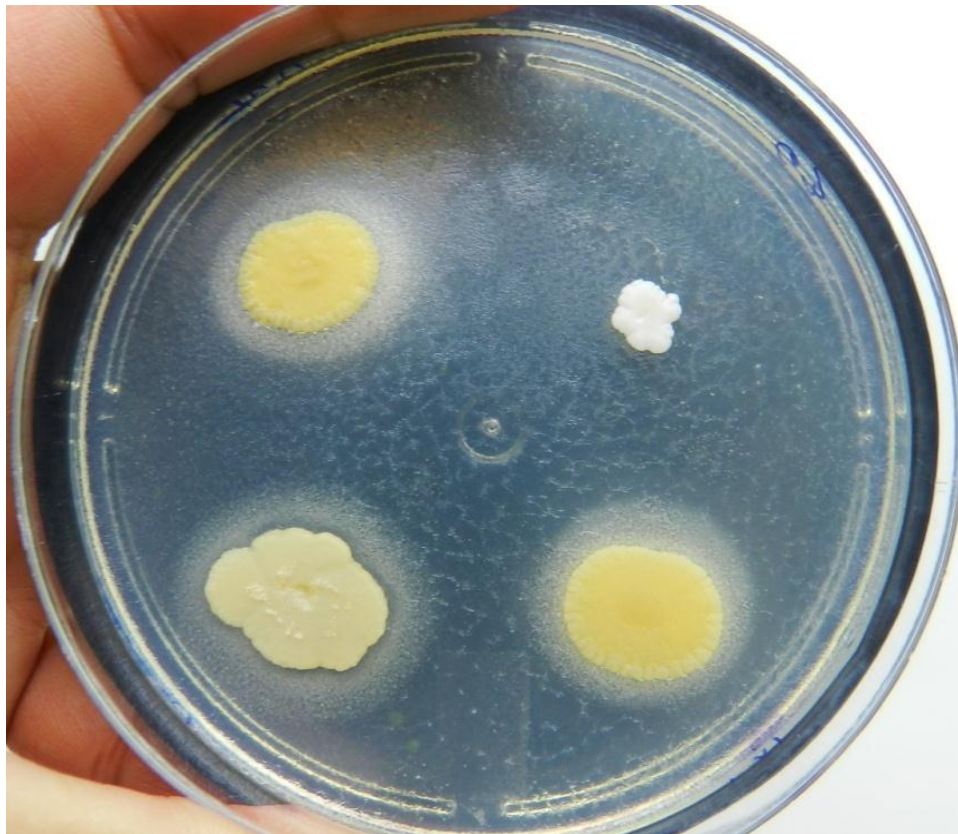


Figura 10. Cultivo de leveduras por picada em meio contendo Tween 80. Observa-se o halo de precipitação do carbonato de cálcio ao redor de três dos quatro isolados, resultado positivo para produção de esterases. O isolado localizado no quadrante superior da direita (colônia branca) não produziu a enzima.

5.9.3 Degradação de caseína

O meio teste para degradação da caseína foi composto somente por 1% Caseína e 2% Ágar. O reagente caseína foi solubilizado por alcalinização (pastilhas de NaOH) e ao final a solução teve o pH ajustado a 7 com ácido

clorídrico fumegante. O halo de degradação da caseína é caracterizado pela formação de um círculo branco amarelado no entorno da colônia (**Figura 11**).



Figura 11. Cultivo de leveduras por picada em meio contendo caseína. Observa-se um halo esbranquiçado de degradação do substrato ao redor dos dois isolados na porção superior da placa, resultado positivo para produção de caseinase.

5.9.4 Degradação de gelatina

O meio teste para degradação da gelatina foi composto por: 1,2% Gelatina, 0,4% Peptona, 0,1% Extrato de levedura e 1,5% Ágar (SMITH; GOODNER, 1958). As placas foram reveladas com solução saturada de sulfato

de amônio por 1 hora. Houve a formação de halos translúcidos ao redor das colônias que degradaram gelatina (**Figura 12**).



Figura 12. Cultivo de leveduras por picada em meio contendo gelatina. Observa-se um halo esbranquiçado de degradação do substrato ao redor de dois dos cinco isolados presentes na placa, resultado positivo para produção de gelatinase.

5.9.5 Degradação de amido

O meio teste para degradação de amido foi composto por: 0,2% Amido solúvel, 0,67% YNB (Yeast Nitrogen Base) e 2% Ágar (ANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). As placas foram reveladas com uma camada de lugol, por cerca de dois minutos. O iodo presente no mordente liga-se às subunidades de amilopectina e amilose do amido. Ao redor das colônias

positivas para a degradação do amido formou-se um halo que varia de transparente a amarelo claro (**Figura 13**).



Figura 13. Cultivo de leveduras por picada em meio contendo amido. Observa-se um halo alaranjado de degradação do substrato ao redor de um dos três isolados presentes na placa, resultado positivo para produção de amilase.

5.9.6 Degradação de CMC (carboximetilcelulose)

O meio teste para degradação de CMC foi composto por: 0,5% Carboximetilcelulose, 0,1% NaNO_3 , 0,1% K_2HPO_4 , 0,1% KCl , 0,05% MgSO_4 , 0,05% Extrato de levedura, 0,1% Glicose e 1,7% Ágar (BAPTISTA et al., 2010). Para facilitar a leitura das placas, as colônias foram removidas com o auxílio de alça microbiológica. As placas foram reveladas com solução de vermelho de Congo 0,1% por cerca de 1 hora. Realizaram-se duas lavagens com solução

de NaCl 1 M. As colônias que degradaram a carboximetilcelulose apresentaram um halo laranja vivo (**Figura 14**).



Figura 14. Cultivo de leveduras por picada em meio contendo carboximetilcelulose. Observa-se um halo alaranjado de degradação do substrato ao redor de dois dos três isolados presentes na placa (situados na porção superior), resultado positivo para produção de celulasas.

5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Gráficos e análises estatísticas foram desenvolvidos nos programas “*GraphPad Prism 6*” (correlação de Perason e ANOVA), “*Statistica 7*” (“*scatterplot*”), “*Past 3*” (cálculos de diversidade) e “*EstimateS 9*” (curva de rarefação).

6 RESULTADOS

6.1 CONDICIONANTES AMBIENTAIS

Comunidades microbianas se comportam de acordo com as variações do ambiente em que se encontram. Com o intuito de elucidar algumas alterações na comunidade de leveduras ao longo do processo de decomposição do detrito avaliado, foram levantados os dados de temperatura do ar e da água, salinidade (médias mensais) e precipitação (total mensal) (Tabela 1). Os dados de temperatura da água foram ponderados porque apesar dos *litter bags* terem sido depositados em ambiente seco, o local é situado às margens da Laguna e apresenta solo lamoso e úmido, sendo facilmente inundado em virtude da variação da maré e do aumento das chuvas.

Ressalta-se que o experimento iniciou-se no começo do inverno e as amostras foram coletadas nas datas: 25 de junho de 2012 (tempo 7 dias), 2 de julho de 2012 (tempo 14 dias), 30 de julho de 2012 (tempo 40 dias), 24 de setembro de 2012 (tempo 100 dias) e 21 de janeiro de 2013 (tempo 100 dias). A temperatura do ar variou entre 12 (junho de 2012, período correspondente ao inverno, aos 7 dias do ensaio de decomposição) e 25 °C (janeiro de 2013, período correspondente ao verão, aos 220 dias do ensaio de decomposição).

A temperatura da água variou entre 12 (aos 14 dias do ensaio de decomposição) e 25 °C (aos 220 dias do ensaio de decomposição). A salinidade apresentou grandes flutuações, o que é comum em ambientes dinâmicos como as marismas, variando entre 6 (100 dias do ensaio de decomposição) e 28‰ (7 dias do ensaio de decomposição). A quantidade de chuvas foi menor no começo do ensaio de decomposição (37 mm em 7 dias e

74 mm em 14 dias), passando a aumentar a partir dos 40 dias (entre 104,8 e 137,8 mm) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Variação das condicionantes ambientais durante o período analisado. Os valores para precipitação representam o total mensal acumulado e os demais valores (temperatura do ar, temperatura da água e salinidade) representam as médias mensais correspondentes às datas de coleta dos *litter bags*.

Tempo de decomposição	7 dias	14 dias	40 dias	100 dias	220 dias
Temperatura do ar (°C)	12	14	15	20	25
Temperatura da água (°C)	14	12	14	16	25
Salinidade (%)	28	23	16	6	14
Precipitação (mm)	37	74	104,8	137,8	136,4

6.2 CARACTERIZAÇÃO DO DETRITO DAS MACRÓFITAS AQUÁTICAS AO LONGO DO PROCESSO DE DECOMPOSIÇÃO

Cada espécie de macrófita aquática apresentou um determinado padrão de perda de massa do detrito em decomposição. *Spartina densiflora* foi a espécie que mais perdeu massa dentre as três, seguida por *Spartina alterniflora* e, em último lugar, por *Scirpus maritimus* (**Figura 15**). Porém a morfologia foliar de *S. densiflora* pode ter interferido neste resultado: suas folhas são enroladas, como uma provável adaptação à perda de água (PERAZOLLO, PINHEIRO; 1991), tornando-se bastante finas, originando um

destrito de tamanho bem mais reduzido do que o das outras espécies e facilmente difusível através da malha dos *litter bags*.

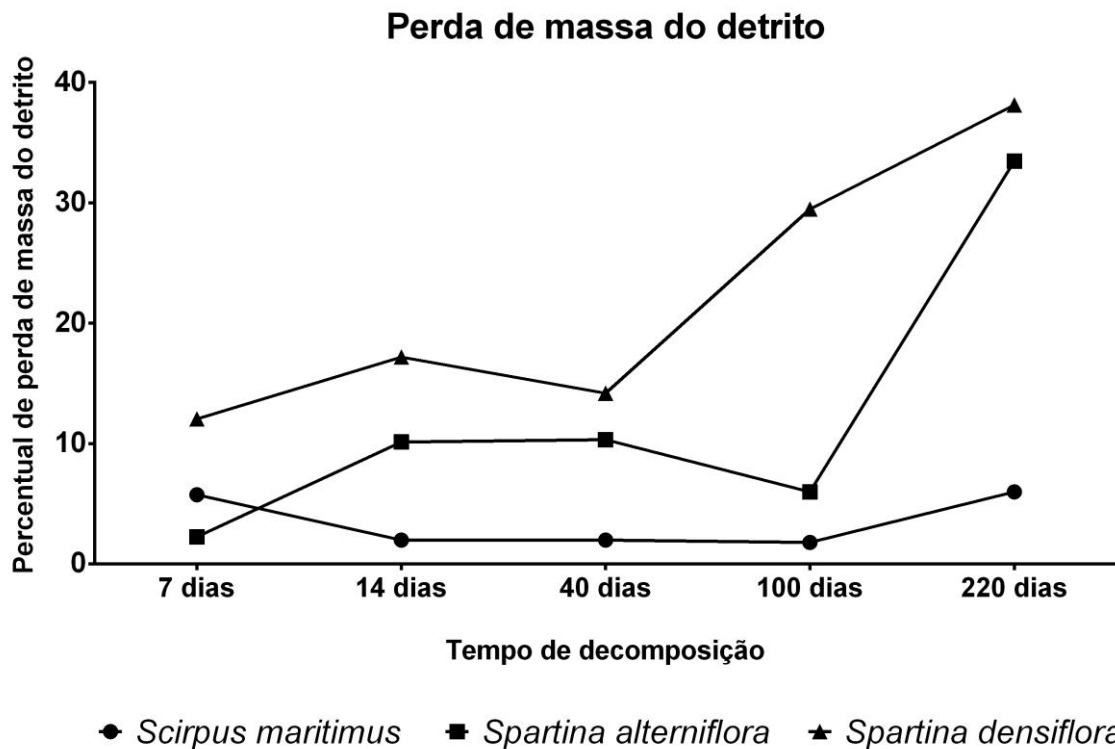


Figura 15. Variação da perda de massa do detrito em decomposição das espécies *Scirpus maritimus*, *Spartina alterniflora* e *Spartina densiflora*.

O período entre 100 e 220 dias de decomposição foi aquele em que todas espécies demonstraram maior perda de massa: redução total de 6% para *S. maritimus*, de 33,48% para *S. alterniflora* e de 38,14% para *S. densiflora*. Os valores cumulativos totais de perda de massa ao final do experimento foram de 17,56% para *S. maritimus*, de 62,22% para *S. alterniflora* e de 100% para *S. densiflora*. A perda total da massa desta última espécie possivelmente está vinculada às reduzidas dimensões de suas partículas e escape pela malha dos “*litter bags*”, pois esta macrófita apresenta tanto o talo quanto as folhas

altamente lignificados (HICKENBICK, FERRO, ABREU; 2004), o que a torna quimicamente mais complexidade e recalcitrante do que as demais espécies (MONTEMAYOR et al.; 2011; SIMÕES et al.; 2011). Portanto, consideraremos somente os resultados de perda de massa das espécies *Scirpus maritimus* e *Spartina alterniflora* como equivalentes ao grau de decomposição do detrito (os detritos de *Spartina densiflora* serão caracterizados apenas pela carga de nitrogênio).

O conteúdo de N presente no detrito ao longo do processo de decomposição, em parte, é retrato da atividade dos microrganismos colonizadores, seja pela carga de N de suas próprias células bem como pelos metabólitos produzidos através da transformação da matéria vegetal (CESAR, ABREU; 2001; FAGERBACK et al.; 1996; STOECKER, CAPUZZO; 1990). A **Figura 16** apresenta a variação da carga de nitrogênio presente nos detritos ao longo do período analisado.

Ao longo da análise, os menores teores de N foram observados em *Spartina densiflora* (menos no tempo 14 dias) e os maiores teores foram encontrados para a espécie *Spartina alterniflora*. Os detritos sofreram reduções na carga de N até o período 40 dias e incremento de N a partir deste período. As baixas de N foram retardadas em *Scirpus maritimus*, já que a espécie sofreu um incremento deste elemento aos 14 dias. Inversamente, *S. densiflora* teve o incremento de N atrasado, já que seguiu apresentando reduções do elemento inclusive aos 40 dias. Porém, após estes períodos, ambas as espécies de macrófitas se comportaram de acordo com o padrão.

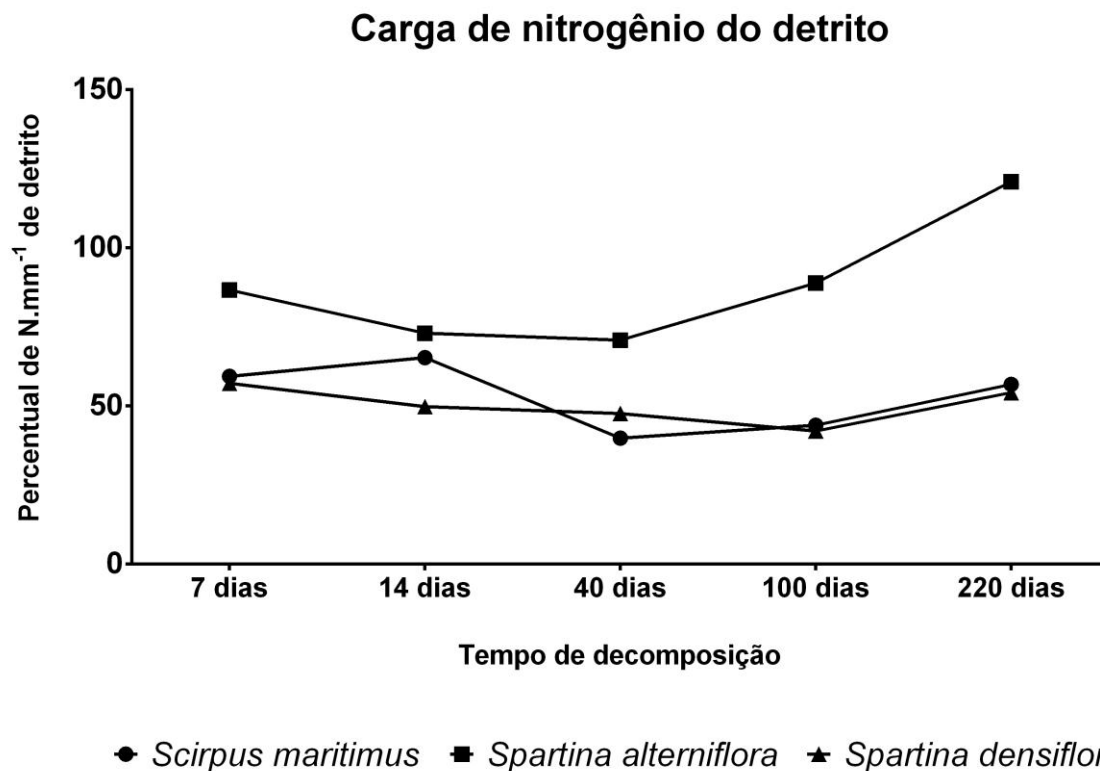


Figura 16. Variação da carga de nitrogênio do detrito em decomposição das espécies *Scirpus maritimus*, *Spartina alterniflora* e *Spartina densiflora*.

6.3 COMUNIDADE DE LEVEDURAS DAS MACRÓFITAS AQUÁTICAS: PLANTA VIVA *VERSUS* DETRITO EM DECOMPOSIÇÃO

Para fins de comparação entre as comunidades de leveduras e fungos leveduriformes colonizadores de macrófitas *in natura* e seu respectivo detrito, realizaram-se isolamentos a partir de plantas *in natura* em trabalho paralelo (FORMOSO, no prelo). Imagens comparativas dos cultivos obtidos entre os tempos 7 e 40 dias de decomposição estão agrupadas na **Figura 17**.

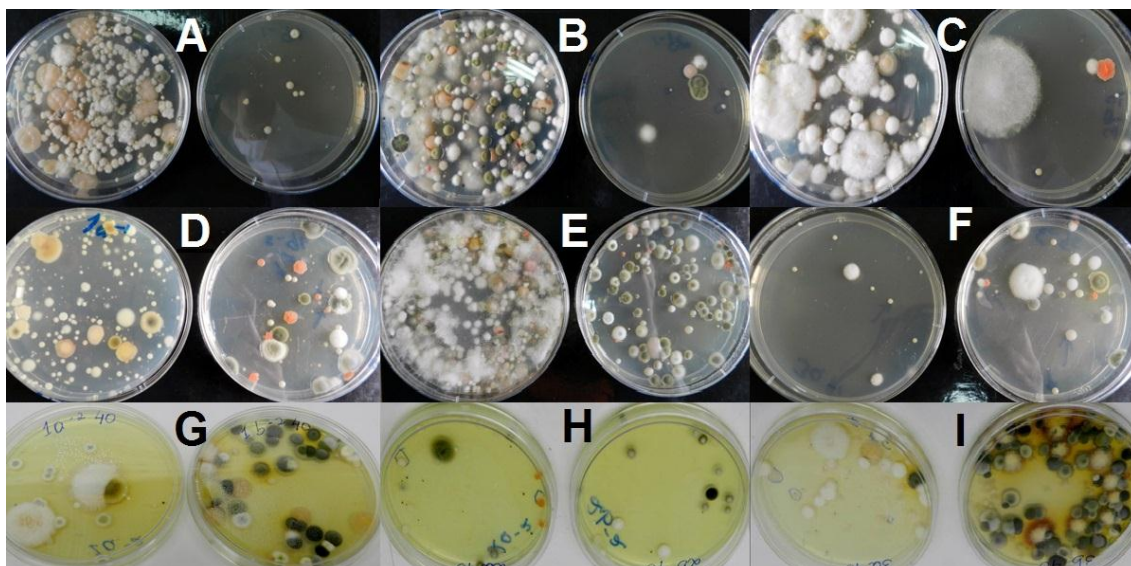


Figura 17. Cultivos de leveduras e fungos leveduriformes, com concentrações iguais, isolados de plantas vivas (à esquerda das fotos) e do detrito em decomposição da respectiva espécie (à direita das fotos). Os tempos de decomposição estão representados pelas linhas: tempo 7 dias na primeira linha (figuras **A**, **B** e **C**), tempo 14 dias na segunda linha (figuras **D**, **E** e **F**) e tempo 40 dias na terceira linha (figuras **G**, **H** e **I**). As espécies das macrófitas aquáticas estão representas pelas colunas: *Scirpus maritimus* na primeira coluna (figuras **A**, **D** e **G**), *Spartina alterniflora* na segunda coluna (figuras **B**, **E** e **H**) e *Spartina densiflora* na terceira coluna (figuras **C**, **F** e **I**).

De um modo geral e conforme o esperado, a carga de leveduras e fungos leveduriformes foi maior nos cultivos obtidos a partir de plantas vivas. Os fungos filamentosos não foram formalmente quantificados, mas visivelmente representaram os colonizadores majoritários, tanto das plantas vivas quanto de seu detrito (mesmo com a adição de bifenila no meio de cultura, agente fungistático que inibe a liberação de esporos dos fungos filamentosos).

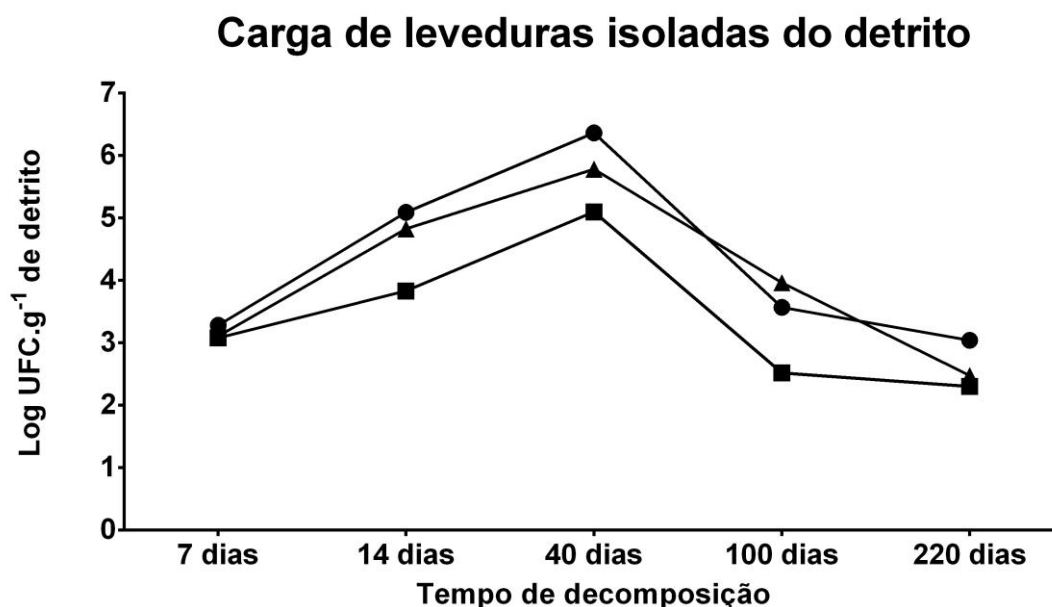
A microbiota associada às plantas vivas é modulada por diversos fatores, seja pela própria planta ou pelas condições ambientais em que ela se encontra (FONSECA, INÁCIO, 2006). As espécies de macrófitas foram colonizadas de forma diferente por leveduras e fungos leveduriformes, mas um padrão não pode ser observado nas plantas *in natura*. Já a carga de leveduras e fungos leveduriformes presente no detrito foi crescente entre os tempos 7 e 40 dias e foi maior para *Scirpus maritimus*, mediana para *Spartina alterniflora* e menor para *Spartina densiflora* (detalhado na sessão 6.4).

Observou-se um crescente número de morfotipos de leveduras e fungos leveduriformes no detrito entre os tempos 7 e 14 dias de decomposição (baixa representatividade de cada morfotipo) e uma queda na variedade dos mesmos no período dos 40 dias (alta representatividade de cada morfotipo). Durante este período, a quantidade total de morfotipos isolados foi similar entre as plantas vivas (n = 15) e o detrito (n = 14) (detalhado na sessão 6.5).

6.4 CARGA DE LEVEDURAS E FUNGOS LEVEDURIFORMES POR ESPÉCIE DE MACRÓFITA AQUÁTICA E POR PERÍODO DE DECOMPOSIÇÃO

A carga de leveduras e fungos leveduriformes presente no detrito variou entre 2,3 e 6,36 log UFC.g⁻¹ de detrito, em *Spartina alterniflora*, aos 220 dias, e em *Scirpus maritimus*, aos 40 dias do ensaio de decomposição, respectivamente. Isolou-se uma maior quantidade de leveduras do detrito de *Scirpus maritimus*, em segundo lugar de *Spartina densiflora*, e em último lugar de *Spartina alterniflora* - à exceção do tempo 100 dias, no qual a carga de microrganismos isolados foi maior em *S. densiflora*, ao invés de *S. maritimus*. As três espécies de macrófitas aquáticas avaliadas abrigaram uma quantidade

crecente de microrganismos entre o período de 7 e 40 dias, enquanto entre o período de 40 e 220 dias de decomposição estes valores foram decrescentes (Figura 18).



● *Scirpus maritimus* ■ *Spartina alterniflora* ▲ *Spartina densiflora*

Figura 18. Variação da carga de leveduras e fungos leveduriformes do detrito em decomposição das espécies *Scirpus maritimus*, *Spartina alterniflora* e *Spartina densiflora*.

Atenta-se para o fato de que os períodos de aumento (7 a 40 dias) e redução (40 a 220 dias) na carga das leveduras e fungos leveduriformes corresponderam, respectivamente, às fases de depleção e incremento de N nos detritos. Ambas variáveis demonstraram correlação negativa entre si, à exceção de *S. alterniflora* (Tabela 4). Isso se deve ao fato dos valores de N desta espécie serem bem superiores aos das outras macrófitas. Numa primeira fase, de estabilização da comunidade, houve o acréscimo na quantidade de

leveduras e depleção do N dos detritos, o que possivelmente indica que o processo de imobilização ocorreu neste período: as leveduras estariam metabolizando e incorporando os nutrientes das plantas. O esgotamento das fontes nutricionais quimicamente mais simples ao longo do tempo pode ter atuado como pressão seletiva na microbiota colonizadora, favorecendo microrganismos adaptados ao consumo de moléculas mais complexas. Na segunda fase, houve um decréscimo na carga de leveduras e um incremento do N, o que muito provavelmente está ligado a subsequente mineralização dos detritos, a liberação da forma orgânica dos nutrientes imobilizados (**Figuras 16 e 18**). Estas mudanças corresponderam a períodos nos quais houve uma desaceleração da perda de massa seguida pelo aumento abrupto da mesma. Porém, estas taxas foram maiores no período de baixas na quantidade de leveduras (**Figura 17**). Tal fato indica que outros microrganismos não ponderados aqui neste estudo possam atuar de forma mais efetiva na redução da massa dos detritos.

Tabela 4. Correlação de Pearson entre a carga de leveduras e fungos leveduriformes (UFC.g⁻¹ de detrito) isolados das espécies *Scirpus maritimus*, *Spartina alterniflora* e *Spartina densiflora* e as variáveis tempo de decomposição; perda de massa do detrito (percentual em relação ao peso inicial do detrito); [N]: concentração de nitrogênio do detrito (percentual de N.g⁻¹ de detrito); T_{ar}: temperatura do ar (°C); T_{água}: temperatura da água (°C); salinidade da água (%); precipitação (mm mensais). Consideraram-se: correlações fracas < 0,5 e correlações fortes ≥ 0,5 (realçados em **negrito**).

	Tempo	Perda de massa	[N]	T _{ar}	T _{água}	Salinidade	Precipitação
<i>S. maritimus</i>	-0,5	-0,69	-0,36	0,38	0,18	0,68	-0,04
<i>S. alterniflora</i>	-0,61	-0,33	0,78	0,33	0,16	0,85	-0,2
<i>S. densiflora</i>	-0,68	-0,57	-0,54	0,23	0,01	0,61	0,19

O volume total das chuvas aumentou na segunda metade do experimento (entre 40 e 220 dias de decomposição) (**Tabela 3**), o que poderia contribuir para desestabilizar a colonização microbiana do detrito estudado e favorecer as baixas na carga de leveduras e fungos leveduriformes, mas estas variáveis foram fracamente correlacionadas entre si. A salinidade foi a única variável ambiental que fortemente correlacionou com a carga microbiana do detrito, de modo positivo, para as três espécies de macrófitas (**Tabela 4**).

Os “*litter bags*” foram comparados de acordo com os valores de decomposição, carga de N e de leveduras que apresentaram, a fim de verificar se as amostras de uma mesma espécie de macrófita ou de determinado tempo foram mais similares do que as outras (**Figura 19**). Um padrão claro não foi observado, mas nota-se que as amostras correspondentes ao mesmo tempo de decomposição apareceram mais próximas no gráfico, distanciando-se com o

passar do tempo até que os “*litter bags*” dos tempos 100 e 220 dias apresentaram-se completamente afastados. O fator mais discrepante, e que pode estar relacionado à dissimilaridade entre as amostras deste período, é a taxa de perda de massa (os valores da espécie *Scirpus maritimus* foram bem menores do que os das demais espécies de macrófitas) (Figura 15).

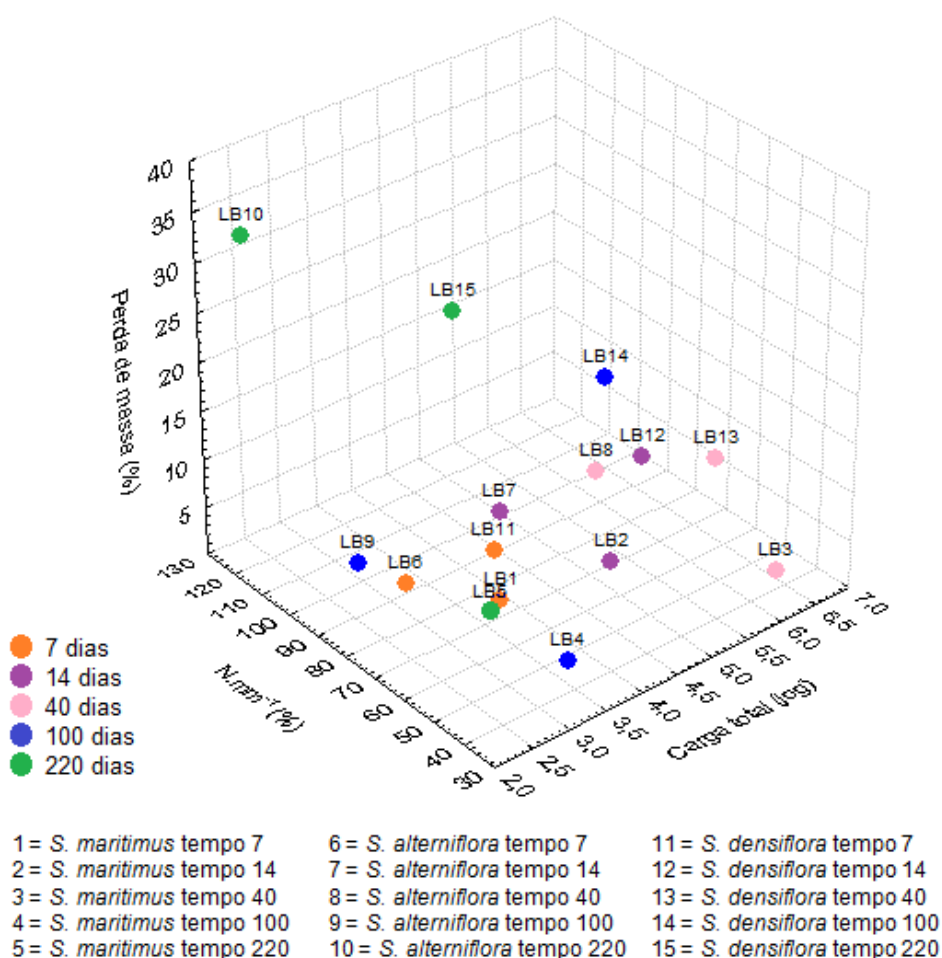


Figura 19. “Scatterplot” dos “*litter bags*” de acordo com a perda de massa percentual, a carga de N percentual por mm⁻¹ de folha e a carga total de leveduras (log UFC por grama de folha). Cada “*litter bag*” foi recebeu a sigla LB acompanhada de um número correspondente à espécie e ao tempo de decomposição (de 1 a 15).

6.5 ISOLAMENTO E DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DE LEVEDURAS E FUNGOS LEVEDURIFORMES COLONIZADORES DO DETRITO DAS MACRÓFITAS AQUÁTICAS

Obteve-se uma coleção com 106 isolados de leveduras e fungos leveduriformes ($n = 68$ e $n = 38$, respectivamente). As leveduras foram previamente agrupadas de acordo com os resultados do teste DBB e da morfologia colonial em *Ascomycota* ($n = 16$) e *Basidiomycota* ($n = 52$). Os fungos leveduriformes foram agrupados de acordo com a morfologia colonial em fungos negros ($n = 28$) e fungos brancos ($n = 10$) (**Figura 20**).

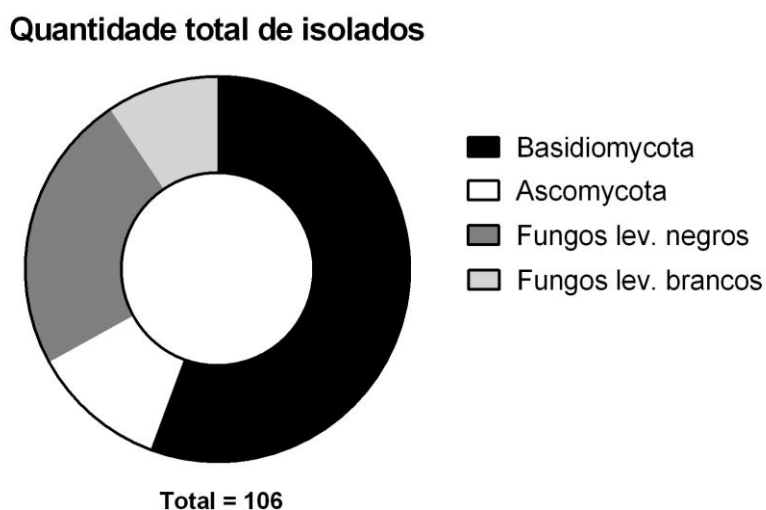


Figura 20. Representatividade dos grupos fúngicos isolados.

Maior parte das leveduras foi isolada de *Spartina densiflora* ($n = 43$), seguida por *Scirpus maritimus* ($n = 35$), e, em último lugar, por *Spartina alterniflora* ($n = 28$). *S. maritimus* foi a maior fonte de isolados de fungos leveduriformes negros, representando quase metade ($n = 15$) de todos os isolados oriundos desta espécie. *Spartina* abrigou uma maior quantidade de *Basidomycota*: cerca de 60% do total dos isolados de cada espécie (*S.*

alterniflora, n = 16, e *S. densiflora*, n = 26) pertenceram a este grupo. *Ascomycota* foi isolado em quantidades similares nas três plantas: correspondeu a aproximadamente 14% dos isolados de *S. maritimus* (n = 5) e *S. densiflora* (n = 5) e a quase 18% dos isolados de *S. alterniflora* (n = 6). Os fungos leveduriformes negros foram maioria em *S. maritimus*, mas representaram cerca de 18% dos isolados de *S. alterniflora* (n = 5) e *S. densiflora* (n = 8). Os fungos leveduriformes brancos tiveram baixo número de isolados (n_{total} = 10), correspondendo a 20% dos isolados de *S. maritimus* (n = 5) e a menos de 10% dos isolados das outras espécies (n = 2 em *S. alterniflora* e n = 3 em *S. densiflora*) (**Figura 21**).

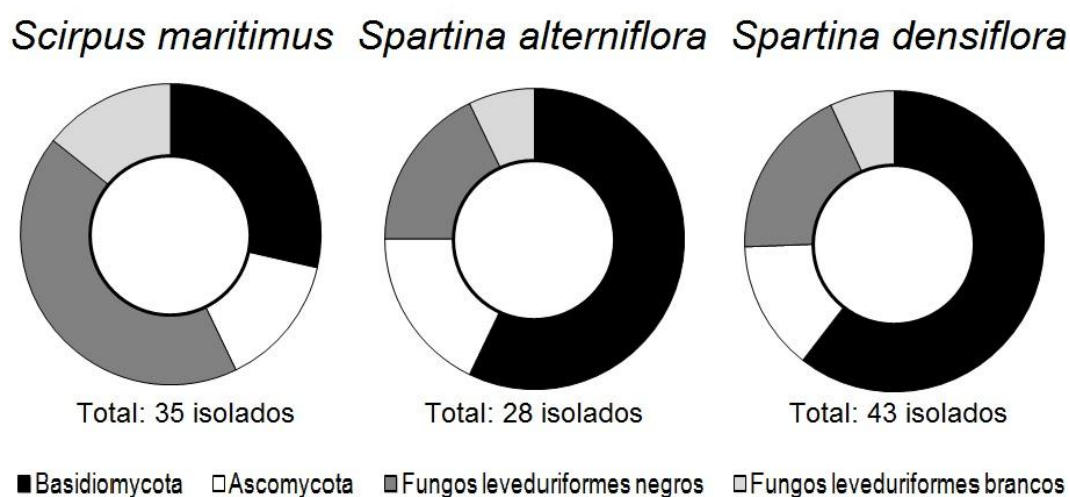


Figura 21. Representatividade dos grupos fúngicos isolados do detrito de cada espécie de macrófita (*Scirpus maritimus*, *Spartina alterniflora* e *Spartina densiflora*).

O comportamento dos grupos com relação aos tempos de decomposição foi avaliado utilizando-se a composição percentual dos grupos. Para tal, utilizou-se a carga (quantidade de UFC/g detrito) de cada grupo em

um determinado tempo em função da carga total do grupo (somatório das cargas isoladas em cada tempo). *Basidiomycota* foi maioria na decomposição inicial dos detritos de *Scirpus maritimus* (50% e 40% da carga total do grupo foi observada em 7 e 14 dias, respectivamente) e *Spartina alterniflora* (76,5% da carga total do grupo foi observada em 14 dias). Tal grupo foi representado em *Spartina densiflora* em todos os tempos (exceto 220 dias) e, diferentemente das outras espécies, foi mais expressivo aos 100 dias (fração correspondente a 55,6% da carga total). *Ascomycota* foi mais numeroso no tempo 40 dias: quase 80% da carga total do grupo em *S. maritimus*; 50% em *S. alterniflora* e 60% em *S. densiflora*.

Os fungos leveduriformes estiveram presentes nos detritos de *Scirpus maritimus* ao longo de todo o ensaio de decomposição, mas foram mais abundantes nos tempos 7 e 40 dias (abrigoando juntos 64% da carga total), sendo que apenas 2% da carga total do grupo foi observada aos 14 dias. O oposto ocorreu com as demais espécies: os fungos leveduriformes negros se concentraram aos 14 dias em *Spartina alterniflora* (60% do total) e aos 100 dias em *Spartina densiflora* (80% do total). Os fungos leveduriformes brancos estiveram presentes nas espécies *S. maritimus* e *S. densiflora* em quantidades similares aos 14 dias (cerca de 35% da carga total) e 220 dias (cerca de 65% da carga total), enquanto em *S. alterniflora* toda a carga deste grupo foi verificada aos 7 dias. As espécies de macrófitas aparentaram distintas composições, porém a maior parte das amostras de tempos equivalentes foram marcadas pela presença dos mesmos grupos (**Figura 22**)

Composição da comunidade de leveduras ao longo do tempo

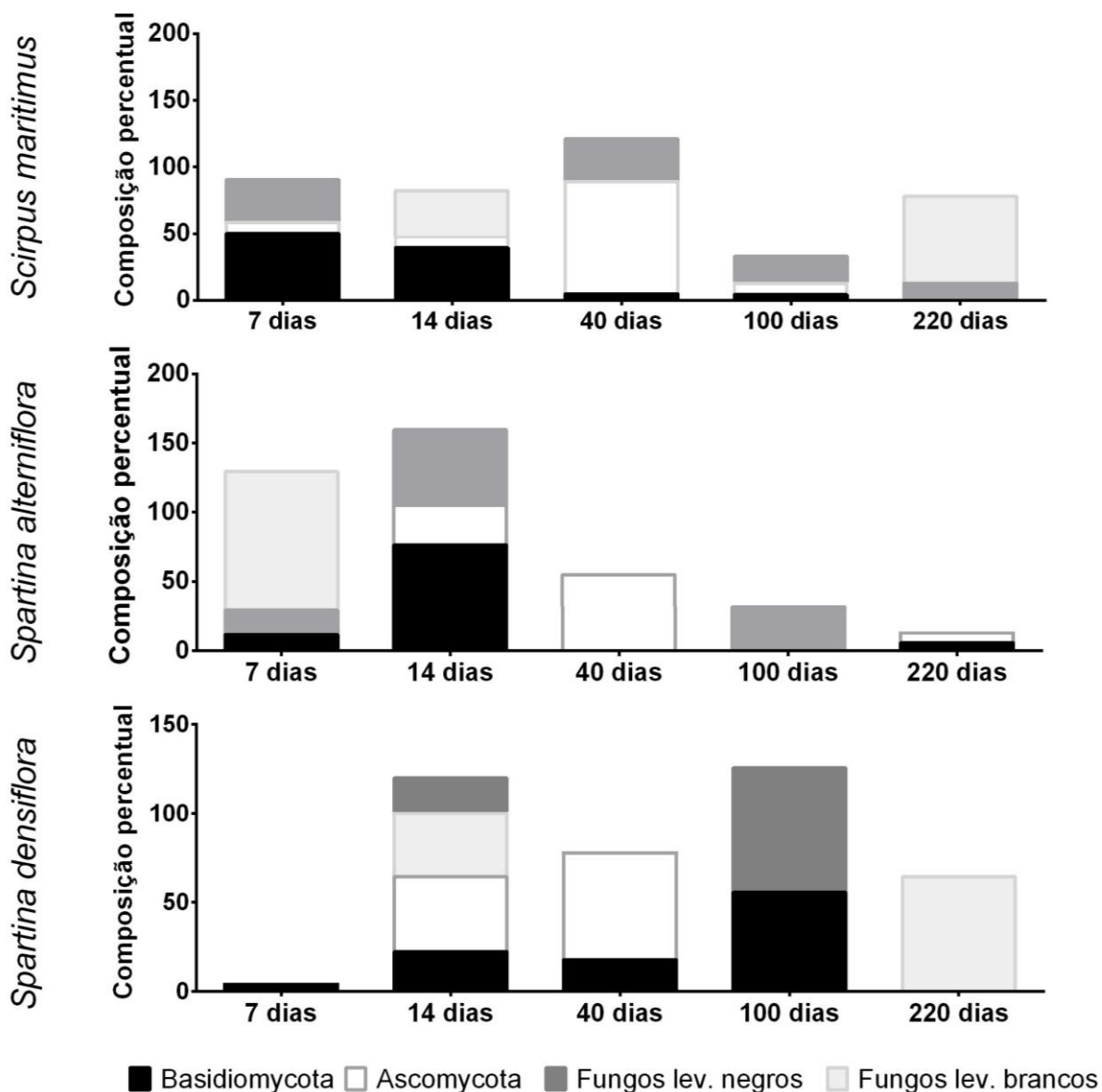


Figura 22. Composição percentual dos grupos fúngicos isolados do detrito de cada espécie de macrófita (*Scirpus maritimus*, *Spartina alterniflora* e *Spartina densiflora*) em diferentes tempos de decomposição (7, 14, 40, 100 e 220 dias). “Fungos lev.”: fungos leveduriformes.

6.6 DIVERSIDADE DE LEVEDURAS E FUNGOS LEVEDURIFORMES COLONIZADORES DO DETRITO DAS MACRÓFITAS AQUÁTICAS

As leveduras foram categorizadas em 21 distintos grupos: 10 grupos foram identificados em nível de espécie, 3 grupos foram discriminados em nível de gênero, 2 grupos foram classificados em complexos e 6 grupos não foram identificados. As leveduras basidiomicéticas foram representadas pelos gêneros *Cryptococcus* sp. e *Tremella* sp., pelas espécies *B. pseudoalba*, *Cryptococcus aureus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces ruberrimus*, *Sporobolomyces beijingsi* e por outros 3 grupos não identificados (**Tabelas 5 e 6; Figura 23**).

Tabela 5. Subgrupos de *Basidiomycota* e sua respectiva morfologia colonial característica.

Morfologia colonial								
Grupo	Cor	Tamanho	Forma	Margem	Elevação	Brilho	Superfície	Consistência
1	Pêssego	Média	Circular	Inteira	Pulvinada	Presente	Lisa	Cremosa
3	Pêssego	Média	Circular	Inteira	Elevada	Presente	Lisa	Cremosa
4	Coral	Variável	Circular	Inteira	Plana	Presente	Lisa	Cremosa
8	Creme	Variável	Circular	Inteira	Convexa	Presente	Lisa	Cremosa
10	Alaranjada	Variável	Circular	Inteira	Plana	Presente	Variável	Cremosa
12	Pêssego	Variável	Circular	Lisa	Elevada	Presente	Lisa	Cremosa
15	Laranja	Variável	Circular	Inteira	Elevada	Presente	Lisa	Cremosa
16	Branca	Variável	Circular	Inteira	Umbonada	Presente	Lisa	Cremosa
17	Branca	Variável	Circular	Irregular	Convexa	Presente	Lisa	Cremosa
18	Pink	Variável	Circular	Lisa	Convexa	Presente	Lisa	Mucóide
21	Laranja	Variável	Circular	Inteira	Convexa	Presente	Lisa	Cremosa
22	Coral	Variável	Circular	Inteira	Convexa	Ausente	Lisa	Cremosa

Tabela 6. Diversidade, representatividade e tipo de detrito colonizado pelos subgrupos de *Basidiomycota*.

Grupo	Sp.	n	Detrito colonizado		
			<i>S. maritimus</i>	<i>S. alterniflora</i>	<i>S. densiflora</i>
1	<i>Cryptococcus aureus</i>	1	14 dias		
3	<i>Bullera pseudoalba</i>	6		7, 14 dias	7, 14 dias
8	<i>Cryptococcus</i> sp.	6	7 dias	14, 220 dias	
10	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	6		14 dias	14, 40, 100 dias
12	<i>Tremella</i> sp.	2	7 dias		7 dias
15	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	12	14, 220 dias	7, 14 dias	7, 14, 40, 100 dias
16	<i>Cr. cellulolyticus/B. pseudoalba</i>	5		7, 14 dias	40 dias
17	Sem identificação	4	40 dias		40 dias
18	Sem identificação	5	100 dias		100, 220 dias
21	Sem identificação	2		14 dias	
22	<i>Sporobolomyces beijingsi</i>	1			14 dias

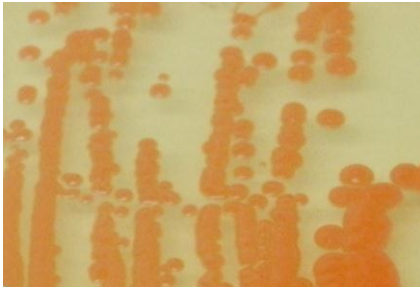
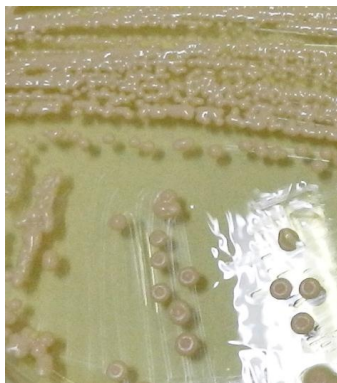
Cryptococcus aureus***Bullera pseudoalba******Sporobolomyces ruberrimus******Tremella sp.******Rhodotorula mucilaginosa******Sporobolomyces beijingsi*****Grupo 17****Grupo 18**

Figura 23. Morfologia colonial de alguns dos representantes de *Basidiomycota* cultivados em ágar YEPG.

As leveduras ascomicéticas foram representadas por 2 grupos sem identificação, pelo complexo *Candida pseudointermedia/Candida intermedia* e pelas espécies *Yarrowia lipolytica*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida zeylanoides* e *Pichia spartinae* (Tabelas 7 e 8; Figura 24).

Tabela 7. Subgrupos de *Ascomycota* e sua respectiva morfologia colonial característica.

Morfologia colonial								
Grupo	Cor	Tamanho	Forma	Margem	Elevação	Brilho	Superfície	Consistência
5	Branca	Média	Circular	Inteira	Elevada	Presente	Lisa	Cremosa
9	Branca	Pequena	Circular	Inteira	Plana	Presente	Lisa	Mucóide
11	Manteiga	Pequena	Circular	Ondulada	Convexa	Ausente	Lisa	Cremosa
17	Branca	Variável	Circular	Lisa	Convexa	Presente	Lisa	Cremosa
23	Branca	Grande	Circular	Ondulada	Elevada	Presente	Lisa	Cremosa
24	Manteiga	Pequena	Circular	Ondulada	Convexa	Ausente	Lisa	Cremosa
25	Branca	Variável	Circular	Inteira	Umbonada	Presente	Lisa	Cremosa

Tabela 8. Diversidade, representatividade e tipo de detrito colonizado pelos subgrupos de *Ascomycota*.

Grupo	Sp.	n	Detrito colonizado		
			<i>S. maritimus</i>	<i>S. alterniflora</i>	<i>S. densiflora</i>
5	<i>C. pseudointermedia/C. intermedia</i>	1	7 dias		
9	Sem identificação	2	14 dias		
11	<i>Yarrowia lipolytica</i>	9	40, 100 dias	40 dias	14 dias
17	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1	14 dias		
23	<i>Candida zeylanoides</i>	1	40 dias		
24	Sem identificação	1	40 dias		
25	<i>Pichia spartinae</i>	1	220 dias		

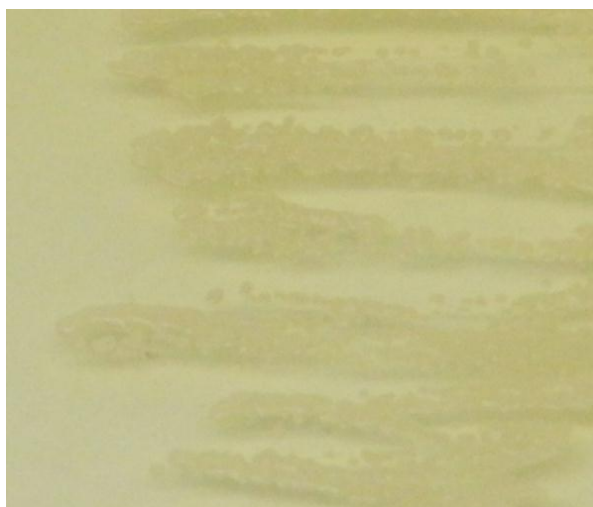
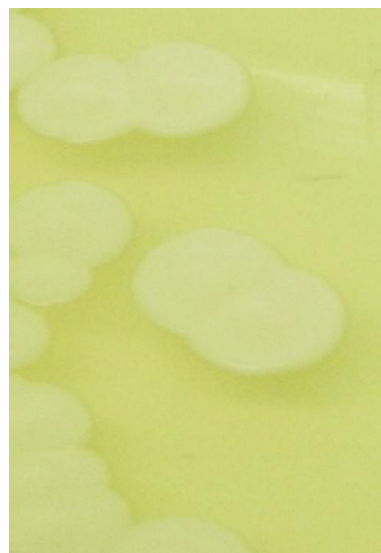
Grupo 9***Candida zeylanoides******Yarrowia lipolytica******Meyerozyma guilliermondii***

Figura 24. Morfologia colonial de alguns dos representantes de *Ascomycota* cultivados em ágar YEPG.

Os fungos leveduriformes negros foram representados pela espécie *Aureobasidium pullulans* (n = 25) e por um grupo não identificado (n = 3) (Tabelas 9 e 10; Figura 25).

Tabela 9. Subgrupos dos fungos leveduriformes negros e sua respectiva morfologia colonial característica.

Morfologia colonial								
Grupo	Cor inicial	Tamanho	Forma	Margem	Elevação	Brilho	Superfície	Consistência
2	Rosa	Variável	Irregular	Filamentosa	Umbonada	Variável	Lisa	Variável
26	Gelo	Variável	Irregular	Filamentosa	Umbonada	Variável	Lisa	Cremosa

Tabela 10. Diversidade, representatividade e tipo de detrito colonizado pelos subgrupos de fungos leveduriformes negros.

Grupo	Sp.	n	Detrito colonizado		
			<i>S. maritimus</i>	<i>S. alterniflora</i>	<i>S. densiflora</i>
2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	25	7, 14, 40, 100, 220 dias	7, 14, 100 dias	14, 100 dias
26	Sem identificação	3		14 dias	14 dias

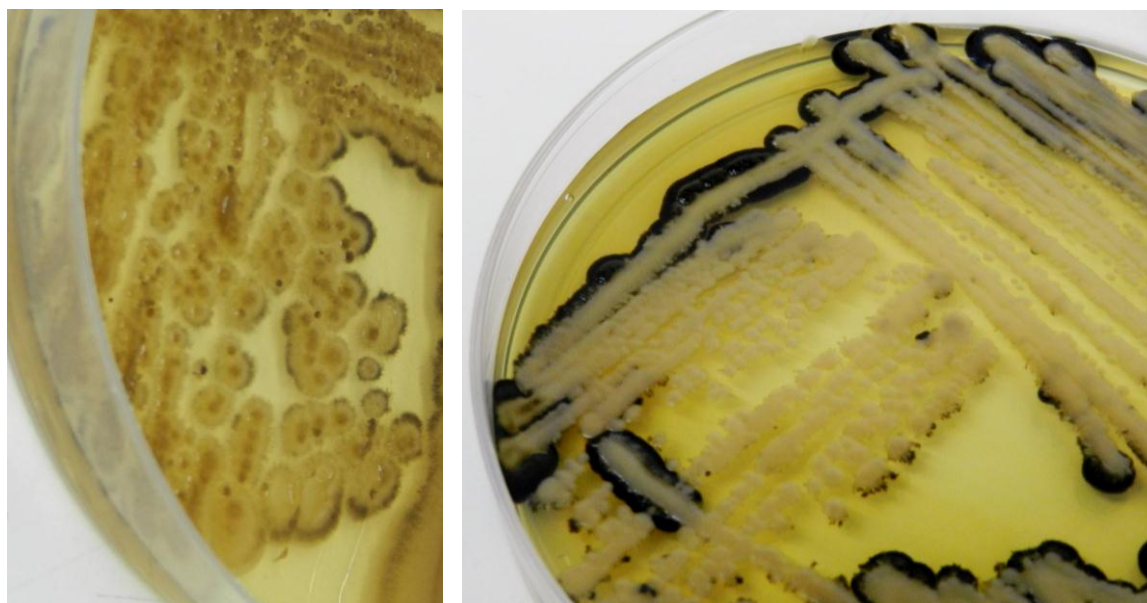


Figura 25. Morfologia colonial dos representantes dos fungos leveduriformes negros cultivados em ágar YEPG. *Aureobasidium pullulans* à esquerda e Grupo 26 à direita.

Os fungos leveduriformes brancos (n = 10) foram agrupados em um único grupo morfológico, identificado como *Acremonium* sp. (**Tabelas 11 e 12; Figura 26**).

Tabela 11. Subgrupos dos fungos leveduriformes brancos e sua respectiva morfologia colonial característica.

Grupo	Cor inicial	Tamanho	Forma	Morfologia colonial				
				Margem	Elevação	Brilho	Superfície	Consistência
19	Salmão	Variável	Irregular	Filamentosa	Convexa	Ausente	Filamentosa	Cremosa

Tabela 12. Diversidade, representatividade e tipo de detrito colonizado pelos subgrupos de fungos leveduriformes brancos.

Grupo	Sp.	n	Detrito colonizado		
			<i>S. maritimus</i>	<i>S. alterniflora</i>	<i>S. densiflora</i>
19	<i>Acremonium</i> sp.	10	40, 100, 220 dias	7, 220 dias	220 dias

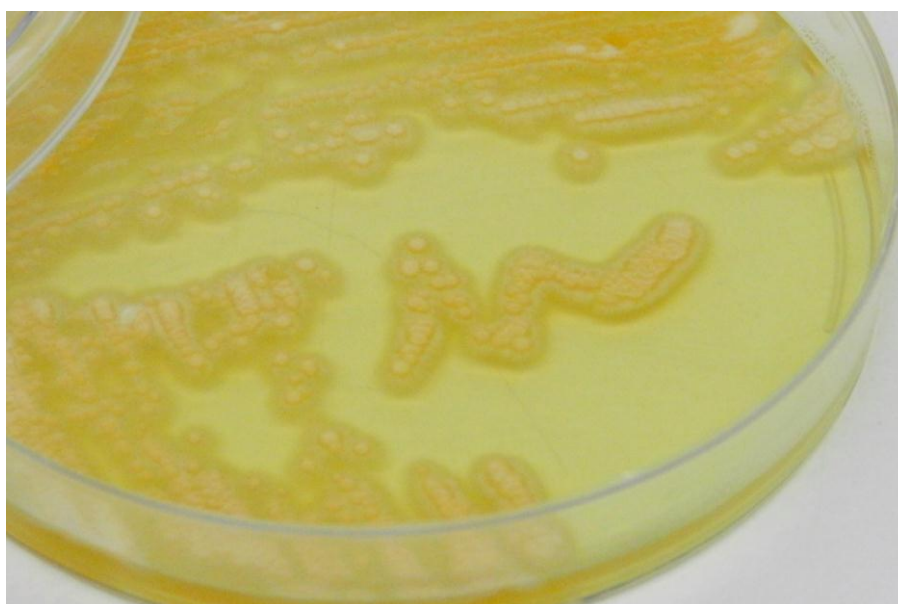


Figura 26. Morfologia colonial dos representantes dos fungos leveduriformes brancos cultivados em ágar YEPG.

Scirpus maritimus e *Spartina densiflora* apresentaram 12 espécies/grupos cada um, enquanto *Spartina densiflora* apresentou 15 espécies. Menos de 30% dos grupos identificados (n= 6 espécies/grupos) foram compartilhados entre as espécies de macrófitas aquáticas: *Acremonium* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus* sp., *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica* e Grupo 17. *Cryptococcus* sp. restringiu-se aos detritos em decomposição inicial (7 e 14 dias) e o Grupo 17 aos detritos do período 40 dias. Os demais grupos compartilhados pelas macrófitas foram isolados em todos os tempos do estudo.

Analisando-se a similaridade de espécies entre as macrófitas aquáticas par a par, pode-se observar que nenhuma espécie além das seis anteriormente citadas foi exclusivamente compartilhada entre *Scirpus maritimus* e *Spartina alterniflora*. Sob a mesma ótica, *S. maritimus* e *Spartina densiflora* compartilharam apenas dois grupos (*Tremella* sp. e Grupo 18). O maior número de espécies compartilhadas somente entre duas macrófitas foi observado entre as *Spartina*, que tiveram em comum quatro espécies/grupos (*Bullera pseudoalba*, *Cryptococcus cellulolyticus/Bullera pseudoalba*, *Sporobolomyces ruberrimus* e Grupo 26).

Spartina alterniflora foi a macrófita com mais espécies/grupos de leveduras exclusivas (n = 5): *Pichia spartinae* e Grupos 8, 9, 13 e 21. *Scirpus maritimus* abrigou sozinha as espécies *Candida pseudointermedia/Candida intermedia*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus aureus* e *Meyerozyma guilliermondii* (n = 4). A única espécie exclusiva de *Spartina densiflora* foi *Sporobolomyces beijingsensis*.

As **Figuras 27, 28 e 29** apresentam a composição percentual específica de *Scirpus maritimus*, *Spartina alterniflora* e *Spartina densiflora*, respectivamente.

Aureobasidium pullulans foi isolado de *Scirpus maritimus* em todos os tempos avaliados, sendo prevalente nos detritos de 7 e 200 dias. *Rhodotorula mucilaginosa* foi a levedura majoritária nos detritos de *S. maritimus* em 14 dias. *A. pulullans* e grupo 17 foram as leveduras predominantes dos detritos de *S. maritimus* aos 40 dias. *Acremonium* sp. foi isolado a partir de 40 dias, predominando inclusive sobre *A. pullulans* no tempo 100 dias. Boa parte das espécies/grupos apareceu somente em determinados tempos e teve baixa representatividade (exceto Grupo 17): *Cryptococcus* sp., *Tremella* sp. e *Candida pseudointermedia/Candida intermedia* em 7 dias; *Cryptococcus aureus* e *Meyerozyma guilliermondii* em 14 dias; *Candida zeylanoides* e Grupo 17 em 40 dias; e *Yarrowia lipolytica* e Grupo 18 em 100 dias. Os detritos de *S. maritimus* não foram marcados por espécies inéditas aos 220 dias (**Figura 27**).

Composição percentual específica de *Scirpus maritimus*

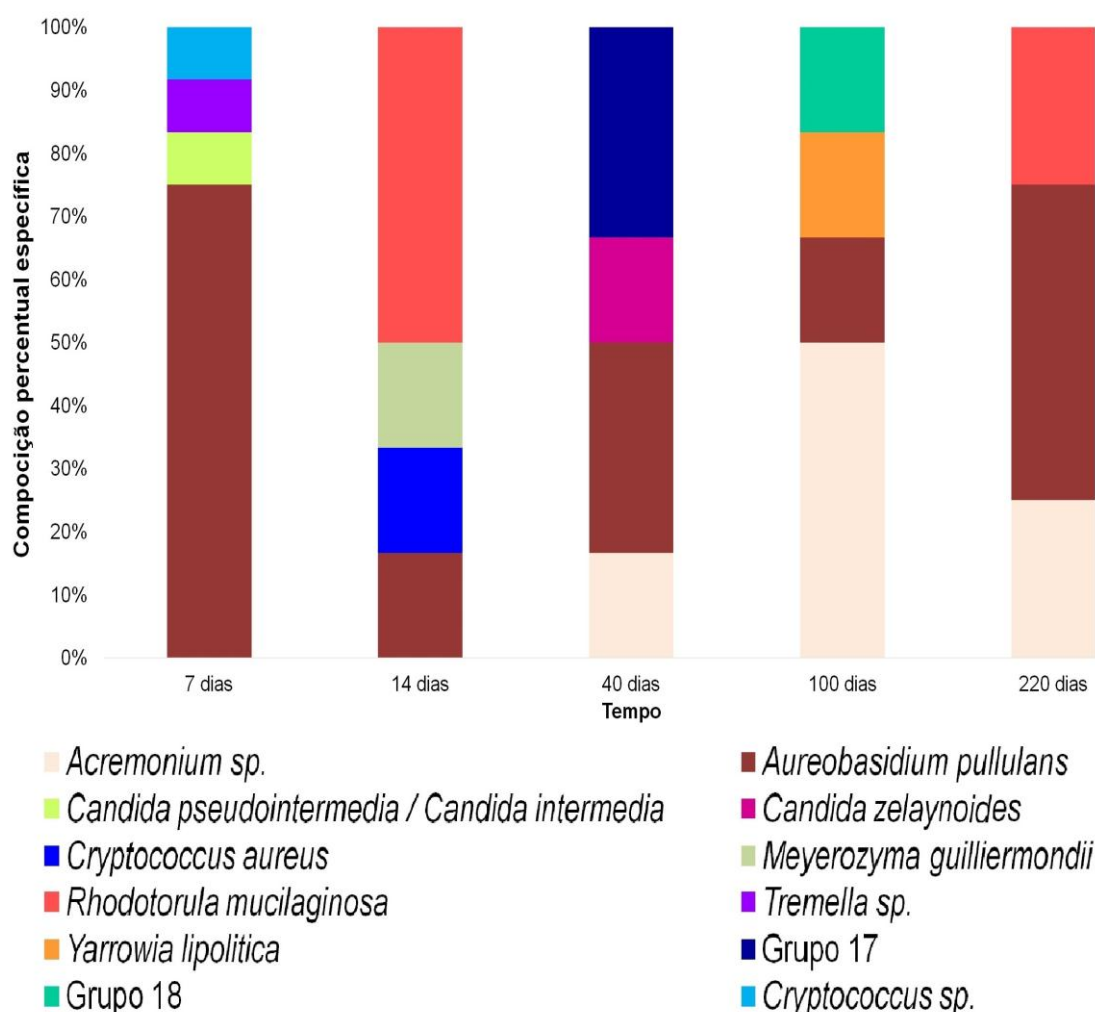


Figura 27. Variação temporal da composição percentual específica da comunidade de leveduras associada a *Scirpus maritimus*.

Mais da metade (60%) das espécies/grupos de leveduras isoladas de *Spartina alterniflora* foram exclusivas de um único período de tempo. Os períodos 7 e 14 dias foram especialmente dominados por muitos grupos de leveduras (73% do total). *Bullera pseudoalba*, *Cryptococcus cellulolyticus/Bullera pseudoalba* e *Rhodotorula mucilaginosa* foram características da decomposição inicial dos detritos de *S. alterniflora* (7 e 14 dias); enquanto o Grupo 17 pareceu estar ligado com a decomposição

intermediária destes detritos (14 e 40 dias). O período 40 dias também foi marcado pela presença de *Yarrowia lipolytica*. *Aureobasidium pullulans* foi a única espécie isolada no período 100 dias (representando frações ínfimas da comunidade de leveduras nos tempos 7 e 14 dias). *Acremonium* sp. foi isolado tanto no detrito em decomposição inicial (7 dias) quanto final (220 dias). *Pichia spartinae* e Grupo 8 também foram isolados de *S. alterniflora* aos 220 dias (**Figura 28**).

Cerca de 40% das espécies/grupos de leveduras isolados de *Spartina densiflora* estiveram presentes apenas na decomposição inicial dos detritos (7 e 14 dias): *Bullera pseudoalba*, *Cryptococcus* sp., *Tremella* sp., *Sporobolomyces beijingensis* e Grupo 26. As leveduras *Cryptococcus cellulolyticus/Bullera pseudoalba*, *Yarrowia lipolytica* e grupo 17 pareceram estar ligadas à decomposição intermediária dos detritos de *S. densiflora* (40 dias). A decomposição tardia foi marcada principalmente pelas espécies *Rhodotorula mucilaginosa* (100 dias), *Acremonium* sp. (220 dias) e Grupo 18 (100 e 220 dias). Algumas destas espécies colonizaram o detrito tanto na decomposição inicial quanto tardia: *Acremonium* sp. e *R. mucilaginosa* (14 dias e 7, 14 e 40 dias, respectivamente), *Aureobasidium pullulans* (14 e 100 dias) e *Sporobolomyces ruberrimus* (14, 40 e 100 dias) (**Figura 29**).

Composição percentual específica de *Spartina alterniflora*

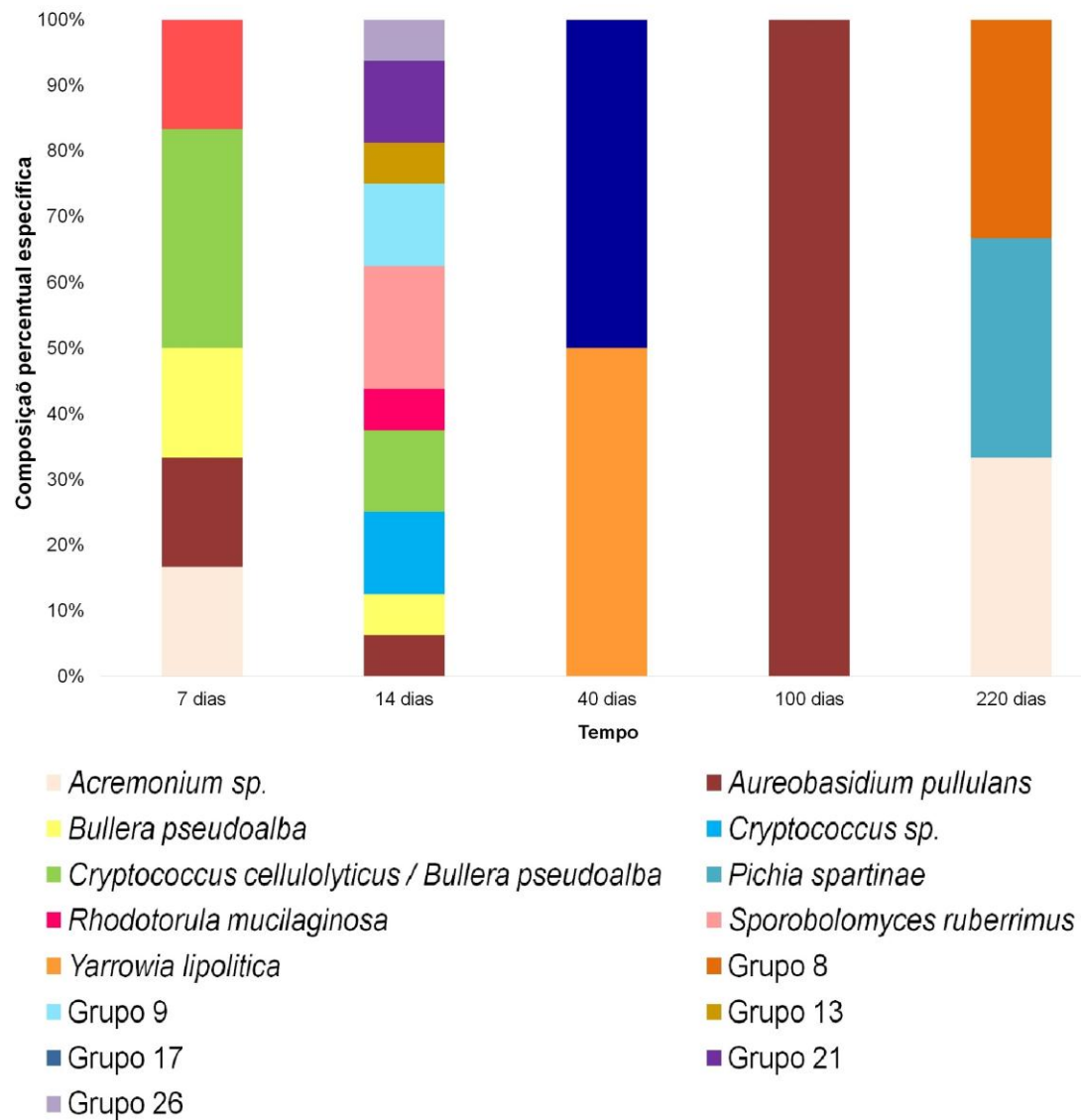


Figura 28. Variação temporal da composição percentual específica da comunidade de leveduras associada a *Spartina alterniflora*.

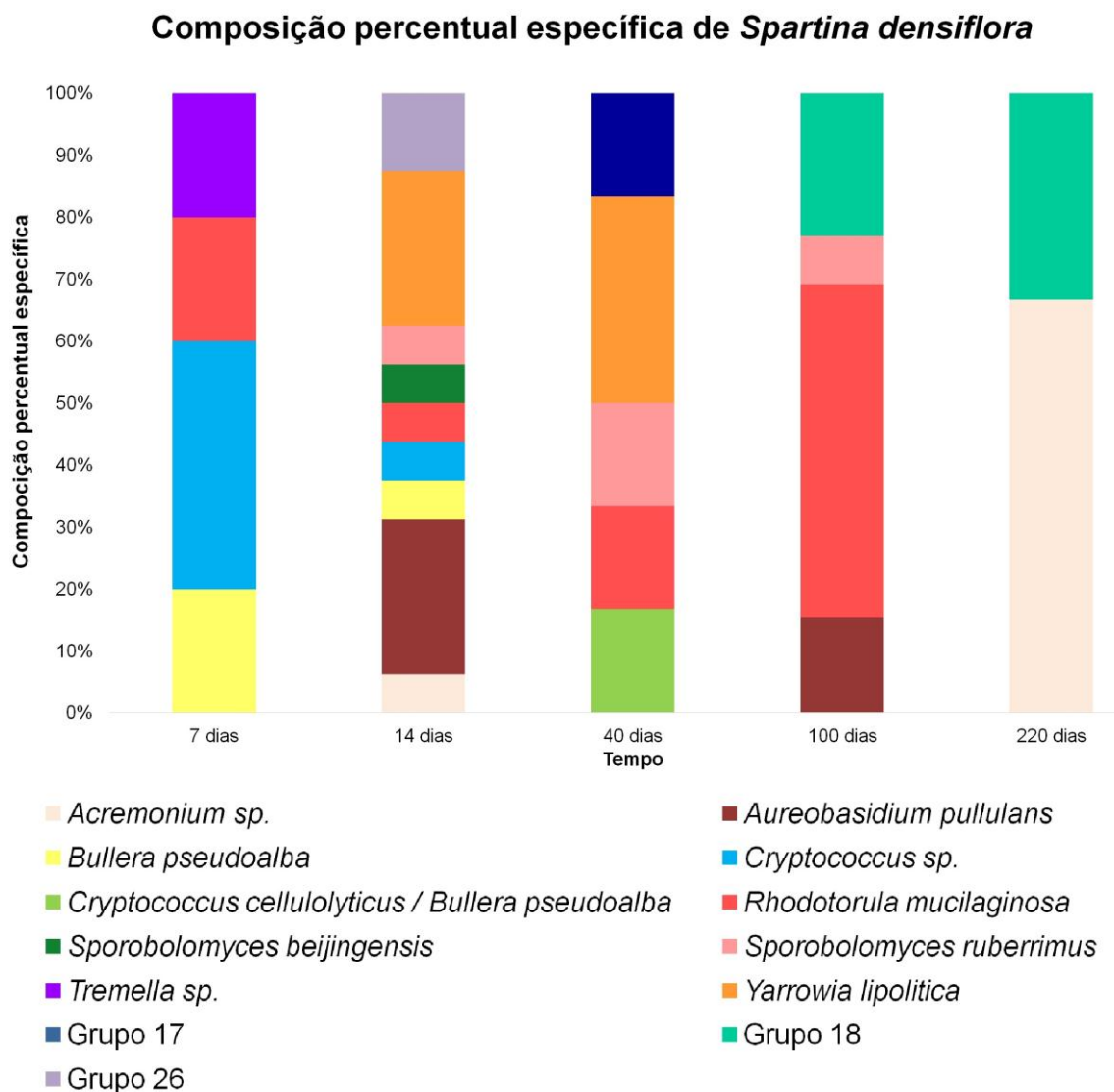


Figura 29. Variação temporal da composição percentual específica da comunidade de leveduras associada a *Spartina densiflora*.

O conjunto de espécies de leveduras foi explorado por uma variedade de índices de diversidade, mas aquele adotado para melhor explicar a diversidade encontrada foi o índice de Shannon-Wiener (H). Tal índice expressa a importância relativa de cada espécie e não apenas a proporção entre espécies e indivíduos; atribuindo maior peso às espécies raras e fazendo prevalecer o componente de riqueza de espécies (MATOS et al., 1990). O índice de Shannon ainda assume que os indivíduos são amostrados de uma

população indefinidamente grande ao acaso (PIELOU, 1983) e que todas as espécies estão representadas na amostra coletada, sendo relativamente independente do tamanho da amostra: quanto maior o valor do índice, mais uniforme será a representatividade de espécies de uma amostra.

O índice de diversidade foi calculado tomando por amostra cada “*litter bag*” (**Figura 30**). As amostras de maior diversidade (H) foram aquelas de *Scirpus maritimus* aos 14 e 220 dias (“*litter bags*” 2 e 5) e de *Spartina alterniflora* aos 7 e 100 dias (“*litter bags*” 6 e 9). Os valores de diversidade não variaram significativamente com o tempo, exceto aqueles das amostras aos 14 dias de decomposição ($P = 0,018$, $\alpha = 0,05$), período em que a composição e o número de espécies foram variáveis entre as macrófitas ($n = 4$ em *S. maritimus*; $n = 10$ em *S. alterniflora*; e $n = 9$ em *S. densiflora*) (ver **Figuras 27, 28 e 29**).

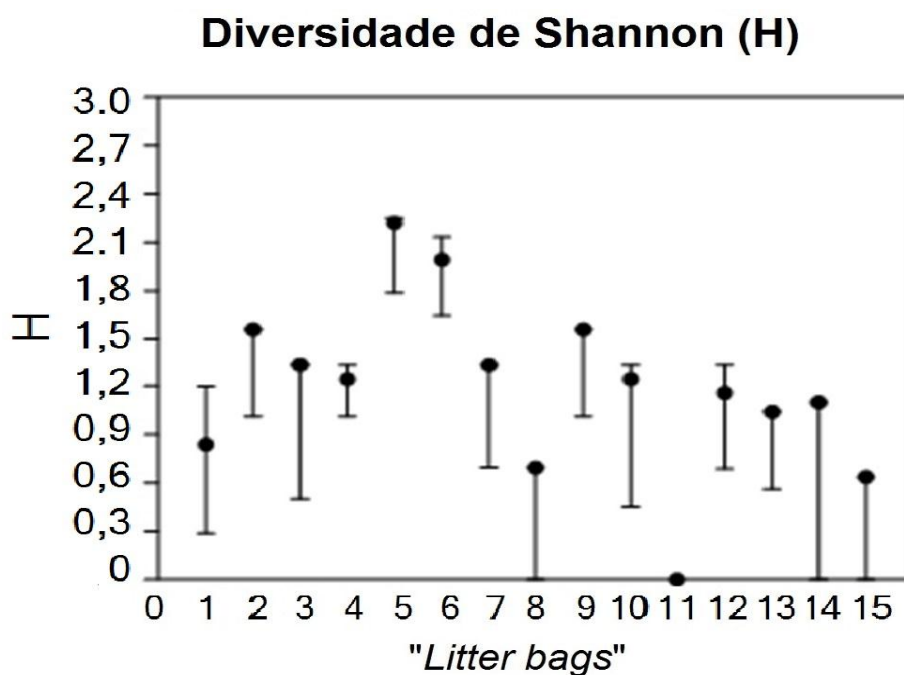


Figura 30. Índice de Shannon-Wiener (H) do conjunto de espécies amostrado em cada “*litter bag*”. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 representam os “*litter*

bags” de *Scirpus maritimus* nos tempos 7, 14, 40, 100 e 220 dias, respectivamente. Os números 6, 7, 8, 9 e 10 representam os “*litter bags*” de *Spartina alterniflora* nos tempos 7, 14, 40, 100 e 220 dias, respectivamente. Os números 11, 12, 13, 14 e 15 representam os “*litter bags*” de *Spartina densiflora* nos tempos 7, 14, 40, 100 e 220 dias, respectivamente.

O desenho de curvas de rarefação possibilita a comparação entre amostras com distintos tamanhos, permitindo avaliar o quanto um estudo se aproxima de capturar todas as espécies do local estudado. Tal ferramenta é considerada a melhor medida para demonstrar o esforço de amostragem de um trabalho (WILLOT, 2001). Na **Figura 31** pode-se visualizar a variação do número de indivíduos entre os diferentes “*litter bags*”.

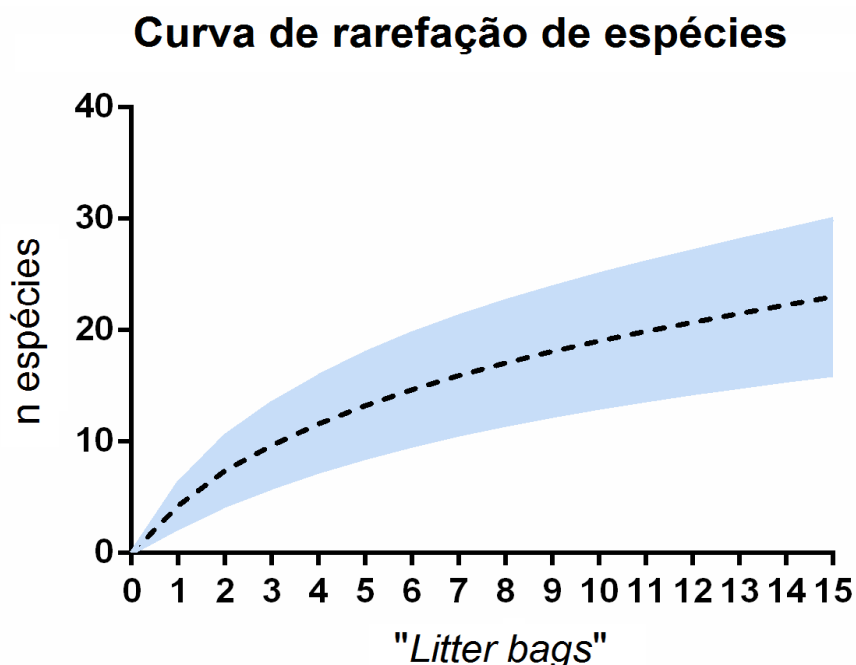


Figura 31. Curva de rarefação das espécies de leveduras encontradas nas amostras coletadas (“*litter bags*”). Os números representam as 15 unidades de esforço amostral (“*litter bags*”) coletadas ao longo do tempo.

A curva aparenta estar se aproximando da estabilidade, o que significa que possivelmente haveriam poucas novas espécies a ser encontradas se mais amostras de detritos fossem coletadas. Alcançar a estabilidade da curva é bastante difícil, pois muitas espécies raras costumam ser adicionadas após muitas amostragens, sobretudo em regiões tropicais. O platô demonstra que nenhuma espécie nova é adicionada e que a riqueza total foi obtida, sendo desnecessárias novas amostragens.

6.7 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS LEVEDURAS E DOS FUNGOS LEVEDURIFORMES COLONIZADORES DO DETRITO DAS MACRÓFITAS AQUÁTICAS

Da coleção de 106 isolados de leveduras e fungos leveduriformes obtidos, apenas um único isolado do grupo *Basidiomycota* não teve o seu potencial biotecnológico aferido, em virtude da perda da viabilidade dos cultivos estoque mantidos em laboratório. Dos isolados testados, todos degradaram tributirina (n = 105); 71,43% degradaram tween 80 (n = 75); 47,6% degradaram gelatina (n = 50); 40,95% degradaram amido (n = 43); 35,2% degradaram caseína (n = 37); e 30,47% degradaram CMC (n = 32). A **Figura 32** apresenta a capacidade de degradação dos grupos morfológicos isolados.

Quantidade de isolados degradadores por grupo de levedura

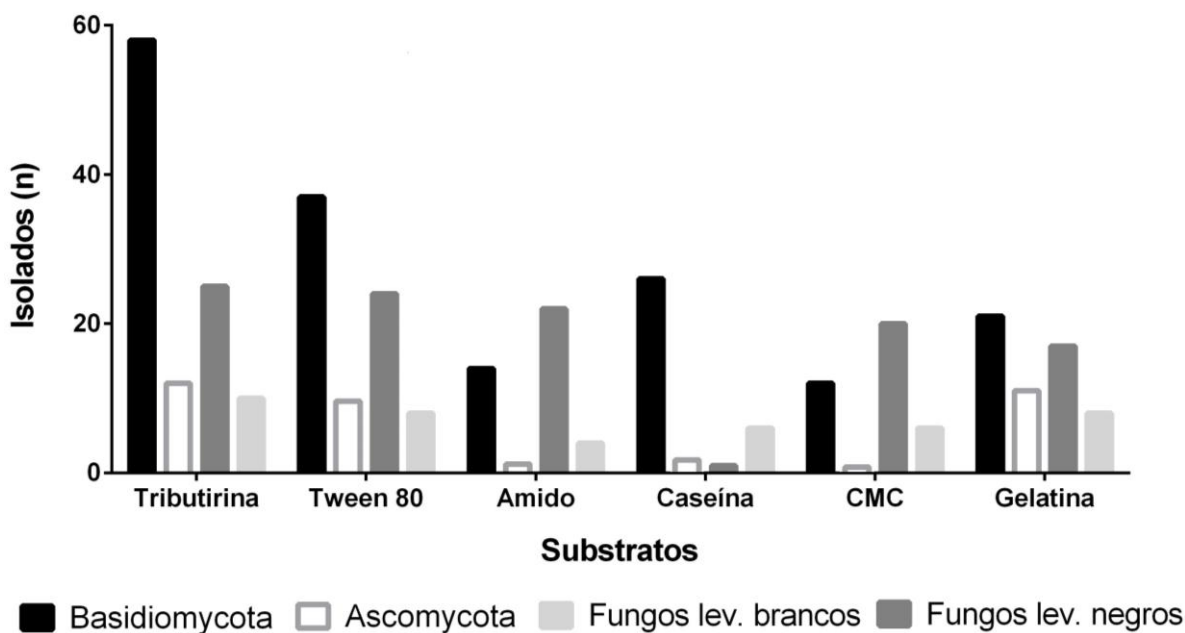


Figura 32. Quantidade de isolados de cada grupo morfológico hábil a degradar os substratos testados.

Como reflexo de sua abundância, *Basidiomycota* foi o grupo dominante na degradação de tributirina, tween 80, caseína e gelatina. Já os fungos leveduriformes negros representaram a maioria degradadora de amido e CMC (**Figura 32**). O grupo, apesar de ter sido representado por poucos isolados, teve maior percentual de degradadores positivos do que *Basidiomycota* e *Ascomycota*, à exceção dos resultados obtidos para o substrato caseína. Os fungos leveduriformes brancos também demonstraram bons percentuais de degradadores positivos, inclusive para degradação da caseína (**Figura 33**).

Percentual de isolados degradadores

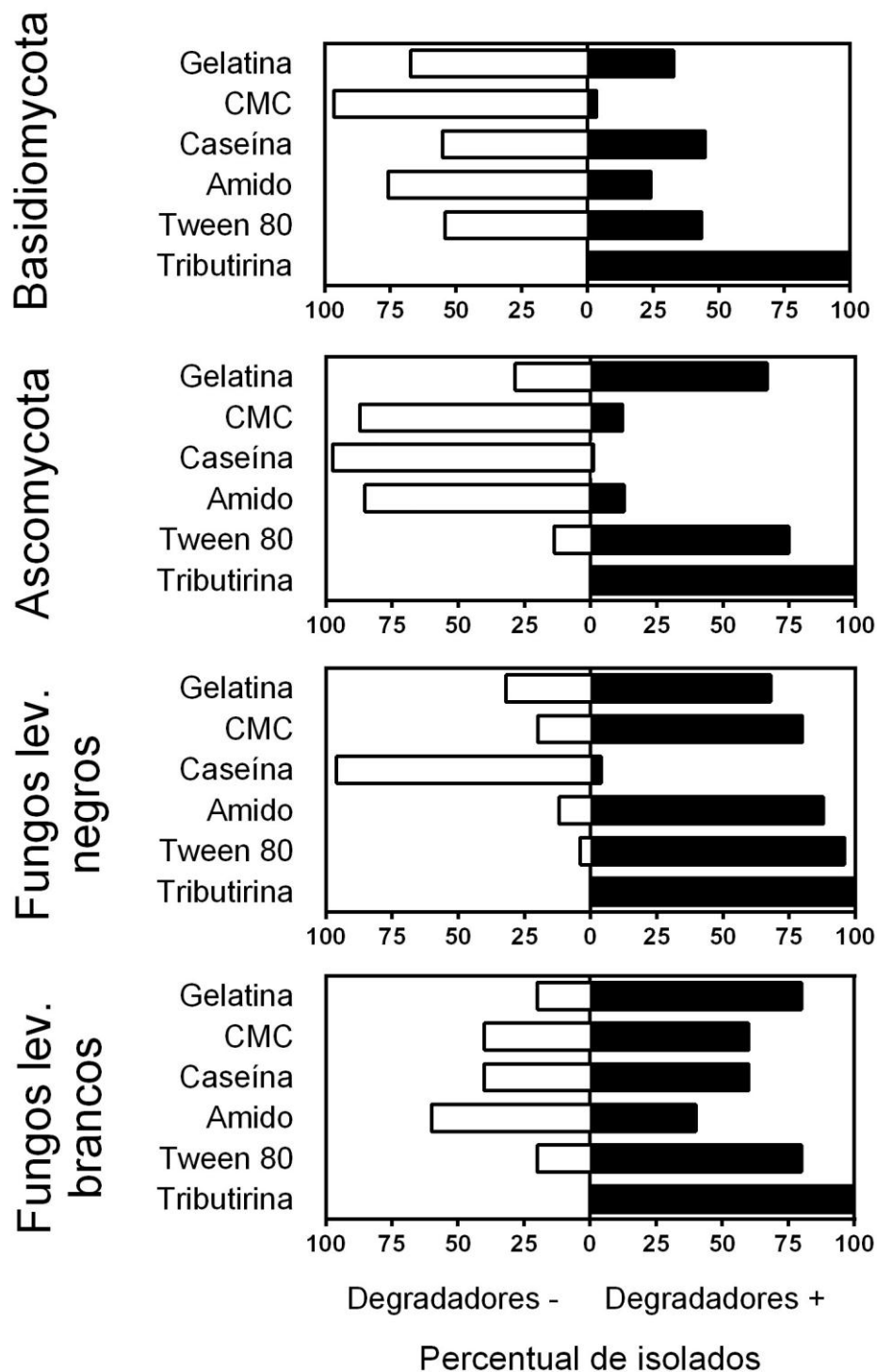


Figura 33. Percentual de degradadores negativos e positivos de cada grupo morfológico. Fungos lev.: fungos leveduriformes.

A capacidade enzimática de determinados microrganismos pode estar relacionada com os nutrientes disponíveis no micro-hábitat de onde ele foi isolado. Mesmo apresentando menor quantidade total de isolados ($n = 29$), o detrito de *S. alterniflora* abrigou maior quantidade de microrganismos degradadores de caseína com relação aos isolados obtidos das outras espécies. Apesar da maior parte dos isolados ter sido obtida do detrito de *S. densiflora* ($n = 42$), houve menor quantidade de isolados consumidores de CMC do que *S. maritimus* (Figura 34).

Quantidade de isolados degradadores por espécie de macrófita

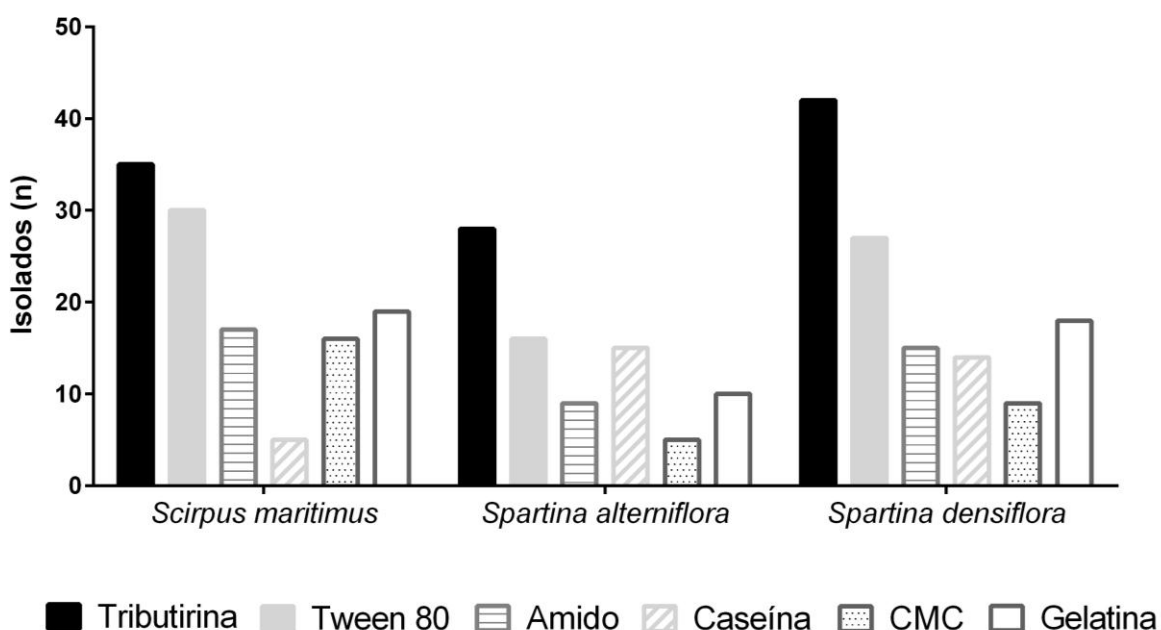


Figura 34. Quantidade de isolados de cada espécie de macrófita capazes de degradar os substratos testados.

Os valores percentuais dos isolados degradadores negativos e positivos dos substratos testados por cada macrófita aquática avaliada estão

expostos na **Figura 35**. Com algumas exceções, os valores foram muito similares entre as espécies. Os percentuais de degradadores positivos isolados de *S. maritimus* foram ligeiramente maiores para a degradação de tween 80, amido, CMC e gelatina. A relação de isolados com habilidade de degradar caseína foi mais alta para os isolados de *Spartina alterniflora*.

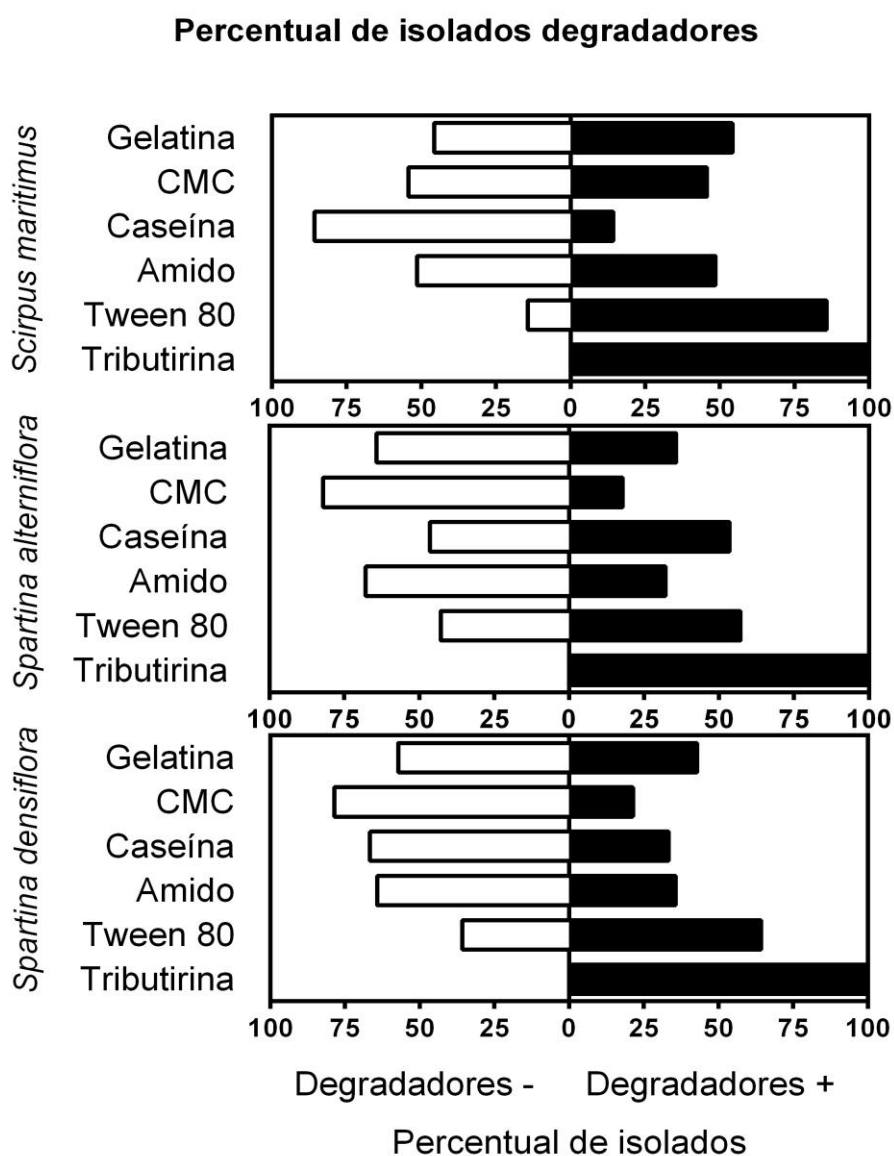
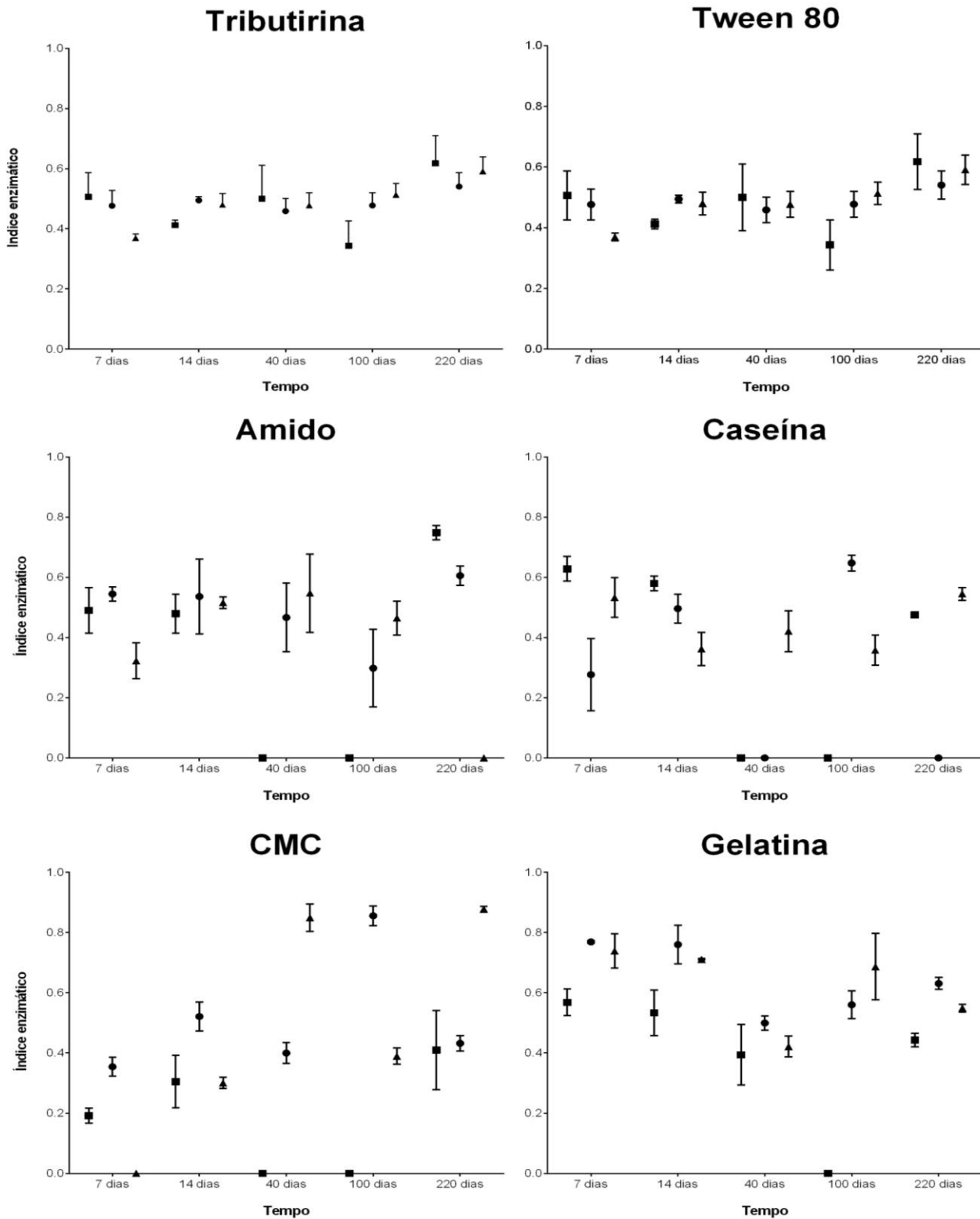


Figura 35. Percentual de leveduras e fungos leveduriformes degradadores negativos e positivos isolados de cada espécie de macrófita aquática.



● *Scirpus maritimus* ■ *Spartina alterniflora* ▲ *Spartina densiflora*

Figura 36. Índices enzimáticos médios (IE médios) das leveduras isoladas de diferentes macrófitas e tempos de decomposição. Quanto menor o

valor de IE, maior o tamanho do halo com relação ao tamanho da colônia da levedura, e, portanto, maior a atividade enzimática.

A atividade lipolítica (degradação de tributirina e tween 80) foi maior para os isolados obtidos de *Spartina densiflora* aos 7 dias e de *Spartina alterniflora* aos 7, 14 e 100 dias ($IE < 0,5$). A atividade de polissacarases (degradação de amido e CMC) ocorreu de forma distinta entre os substratos testados. As amilases produzidas pelos isolados de *S. densiflora* aos 7 dias e de *Scirpus maritimus* aos 100 dias apresentaram maior atividade ($IE < 0,4$) do que aquelas produzidas por isolados de outros “*litter bags*”. Já as celulases das leveduras isoladas aos 7 e 14 dias, de uma maneira geral, tiveram melhores índices enzimáticos ($IE < 0,4$). As proteases também apresentaram diferentes padrões: a gelatinase foi mais bem produzida pelos isolados de todas as macrófitas aos 40 dias, enquanto a caseinase dos isolados de *S. maritimus* aos 7 dias e de *S. densiflora* aos 14 e 100 dias foram as mais ativas (**Figura 36**).

Os índices enzimáticos, no geral, foram afetados tanto pelo tempo de decomposição dos detritos quanto pela espécie de macrófita (**Tabela 13**).

Tabela 13. ANOVA bifatorial sobre a variável índice enzimático médio (IE) de cada espécie de macrófita (tratamento) e tempo de decomposição. NS: não significativo.

IE médio de degradação	Valores de P para as diferentes fontes de variância		
	Sp. macrófita	Tempo	Sp. macrófita x Tempo
Tributirina	NS	<0,0001	0,0001
Tween 80	0,03	0,0002	0,0016
Amido	NS	<0,0001	<0,0001
Caseína	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CMC	0,04	<0,0001	<0,0001
Gelatina	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Basidiomycota degradadores de tributirina foram mais bem representados nos detritos de *S. maritimus* e *S. densiflora* aos 14 dias e de *S. densiflora* aos 100 dias de decomposição. O período 14 dias também abrigou maior parte dos basidiomicetos degradadores de tween 80 em *S. alterniflora* e *S. densiflora*, enquanto em *S. maritimus* este grupo foi majoritário aos 100 dias. Os basidiomicetos isolados de *S. densiflora* não apresentaram a habilidade de degradar amido, enquanto para as outras espécies os isolados do grupo com tal habilidade foram obtidos em 7 e 14 dias. A caseína foi consumida majoritariamente pelos basidiomicetos isolados em 14 dias. Os basidiomicetos isolados de *S. alterniflora* não degradaram CMC. Tal substrato foi degradado pelos isolados de 14 dias em *S. maritimus* e 40 dias em *S. densiflora*. Os basidiomicetos isolados a partir de 7 dias foram hábeis a degradar gelatina (à exceção dos colonizadores de *S. alterniflora*), mas a maioria dos isolados com esta capacidade foi obtida em 14 e 40 dias (**Figura 37**).

Os ascomicetos de *S. maritimus* isolados na fase inicial de decomposição (7 e 14 dias) foram hábeis a degradar somente tributirina e caseína. Os isolados obtidos aos 40 e 100 dias não degradaram caseína, mas sim outros dois substratos: amido (40 dias) e tween 80 (em ambos os tempos). Já aqueles isolados de *S. alterniflora* apresentaram maior capacidade de degradação: além de tributirina (7, 40 e 220 dias) e tween 80 (14 e 40 dias) também consumiram CMC (220 dias). O perfil de degradação dos isolados de *S. densiflora* foi bem similar aos de *S. alterniflora*, porém estes não foram hábeis a degradar caseína. (**Figura 38**).

Os fungos leveduriformes negros isolados de *S. maritimus* não foram hábeis a degradar caseína. Os outros substratos foram degradados por maior parte dos isolados obtidos desta espécie aos 7 dias. Os isolados deste grupo obtidos de *S. alterniflora* foram degradadores positivos de todos os substratos testados, sendo isolados em 7 e 14 dias (a caseína foi degradada somente pelos fungos isolados em 7 dias). Os fungos deste grupo isolados de *S. densiflora* foram obtidos em 14 e 100 dias, apresentando habilidade de degradar todos os substratos, à exceção de caseína (**Figura 39**).

Os isolados de *Acremonium* sp. oriundos de *S. maritimus* aos 100 dias de decomposição foram hábeis a degradar todos os substratos, enquanto os de 14 dias não degradaram amido nem CMC e os de 220 dias não degradaram caseína. Os fungos isolados de *S. alterniflora* não apresentaram habilidade de degradar tween 80 e CMC. Todos os substratos foram degradados pelos isolados de *Acremonium* sp. obtidos de *S. densiflora*, à exceção do amido e da CMC e da gelatina (estes últimos somente aos 14 dias) (**Figura 40**).

Perfil de degradação de Basidiomycota

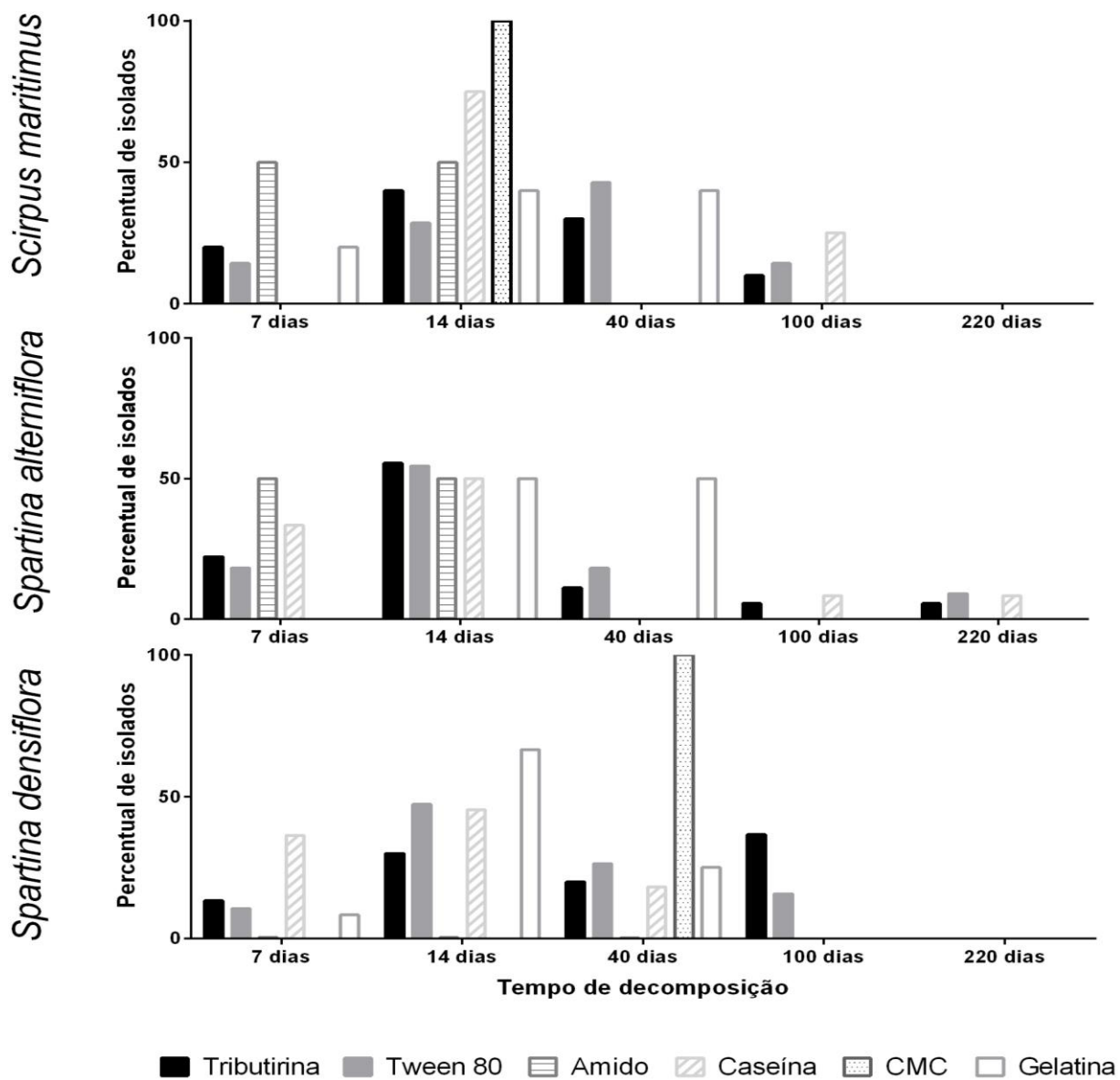


Figura 37. Perfil de degradação de *Basidiomycota* ao longo da decomposição do detrito das três espécies de macrófitas estudadas.

Perfil de degradação de Ascomycota

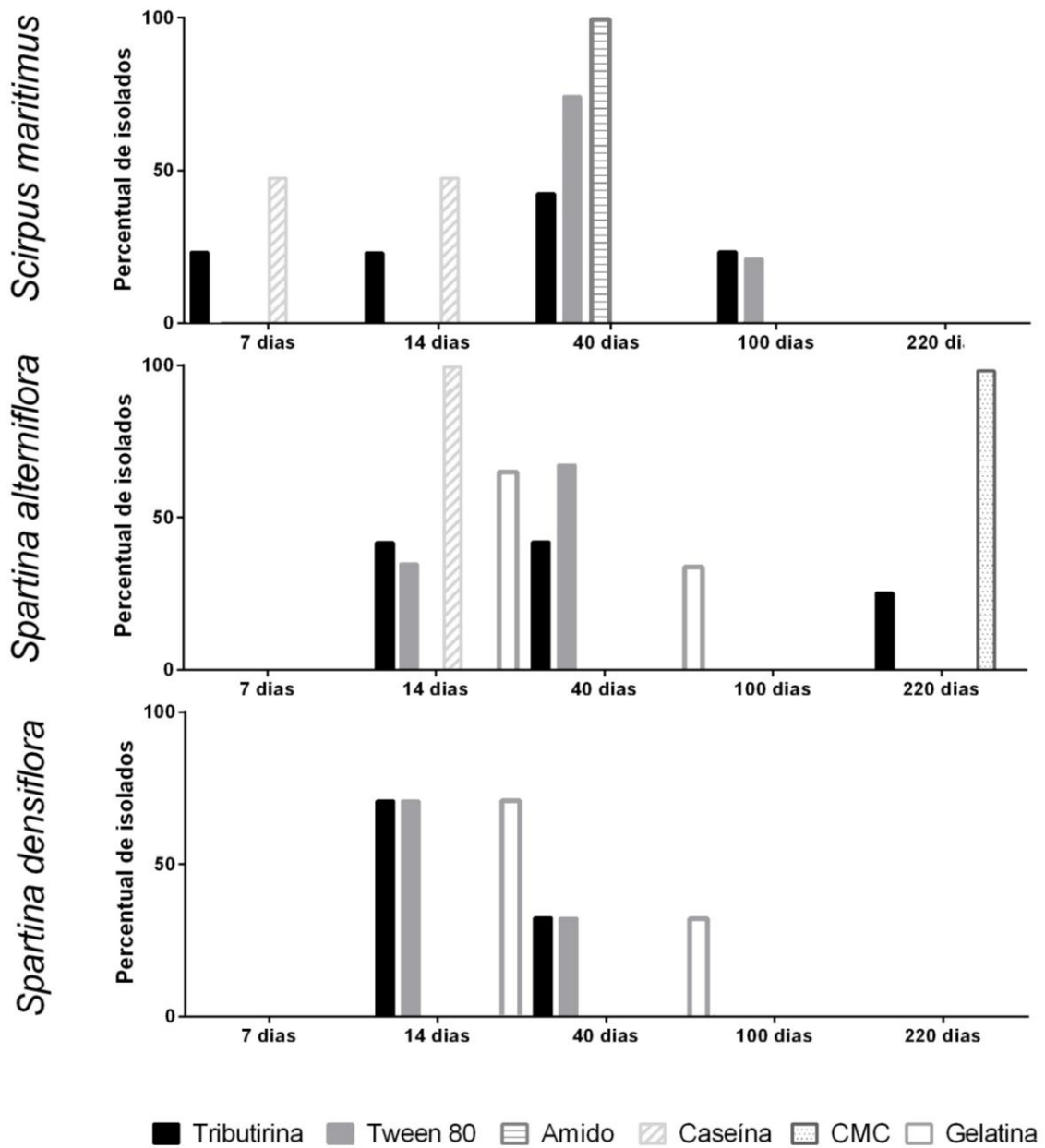


Figura 38. Perfil de degradação de *Ascomycota* ao longo da decomposição do detrito das três espécies de macrófitas estudadas.

Perfil de degradação dos fungos leveduriformes negros

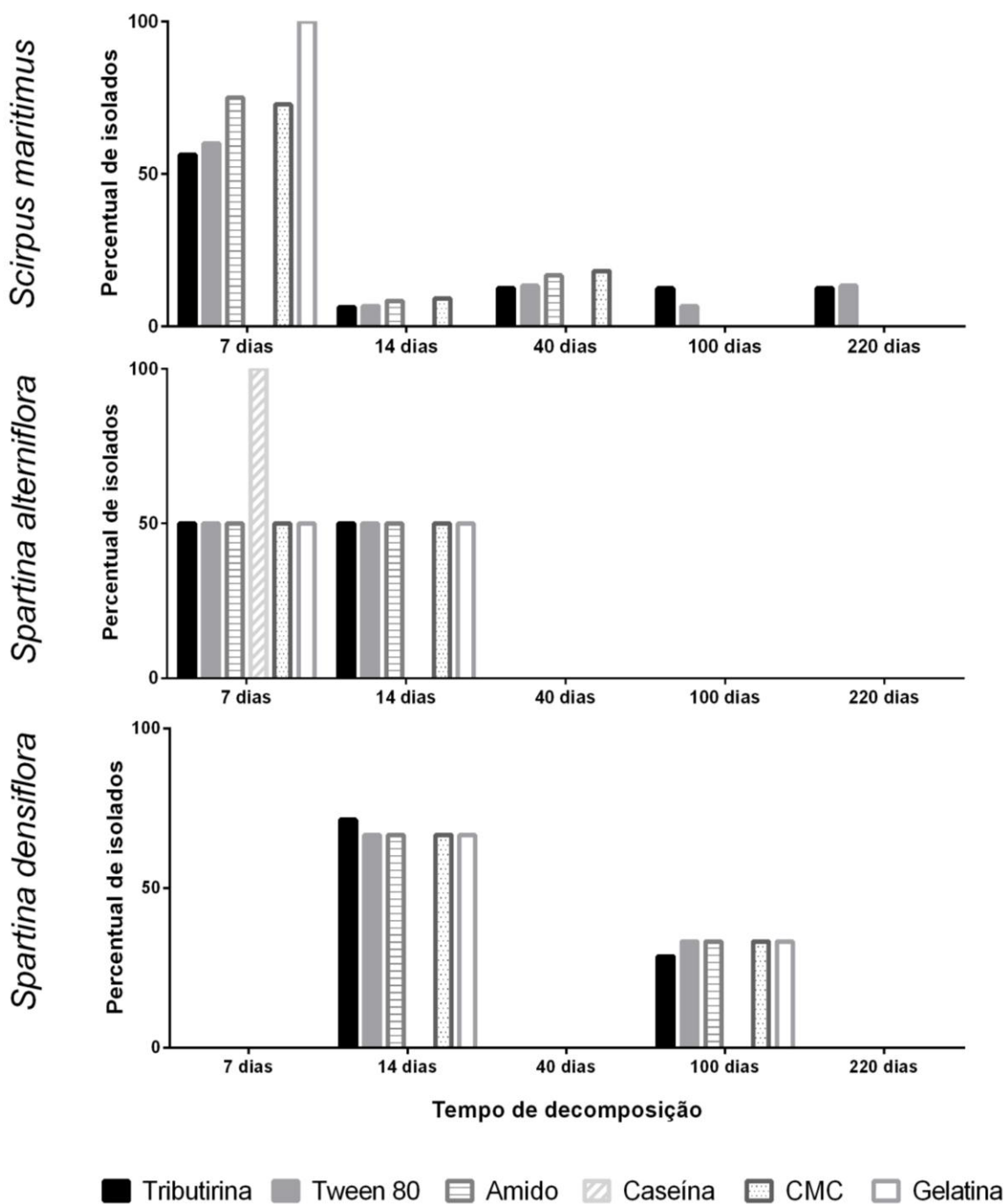


Figura 39. Perfil de degradação dos fungos leveduriformes negros ao

longo da decomposição do detrito das três espécies de macrófitas estudadas.

Perfil de degradação dos fungos leveduriformes brancos

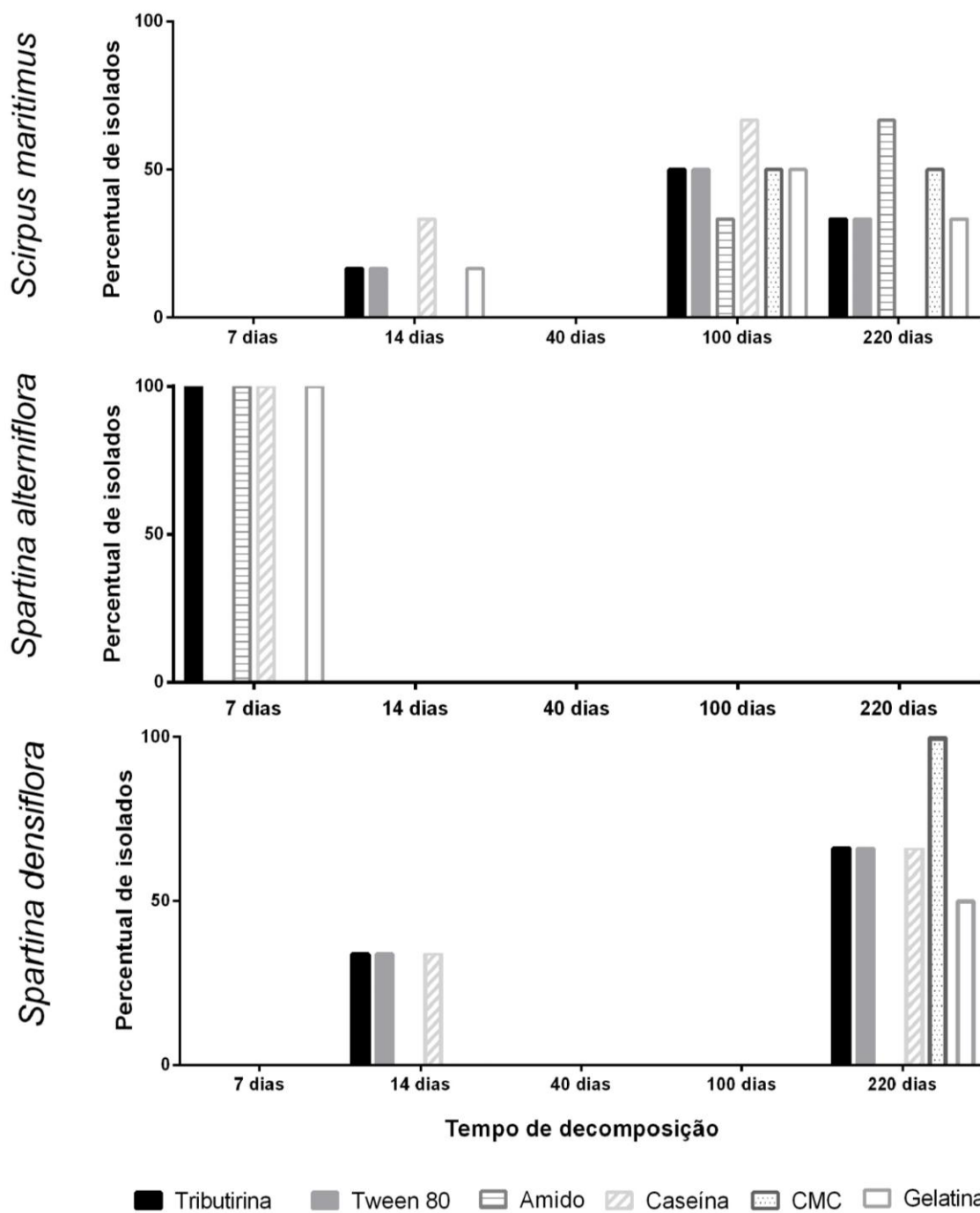


Figura 40. Perfil de degradação dos fungos leveduriformes brancos ao longo da decomposição do detrito das três espécies de macrófitas estudadas.

Consideraram-se isolados com produção enzimática satisfatória aqueles que apresentaram índice enzimático médio (IE) $\leq 0,5$. As maiores proporções de isolados degradadores positivos cujo IE médio foi inferior ou igual a 0,5 foram encontradas para os substratos CMC (81,25% dos isolados positivos) e tributirina (57,14% dos isolados positivos). Os demais substratos apresentaram as seguintes frequências de isolados com boa produção enzimática (IE médio $\leq 0,5$): amido - 39,53% dos isolados positivos; caseína - 35,13% dos isolados positivos; gelatina - 24% dos isolados positivos; e tributirina - 17,33% dos isolados positivos. Os isolados de maior atividade enzimática (menor IE) de cada enzima foram compilados na **Tabela 14**.

Os detritos em fase de decomposição inicial abrigaram maior quantidade de isolados cuja atividade enzimática foi mais expressiva. Sob este aspecto, as leveduras parecem desempenhar maior atividade na decomposição inicial dos detritos das macrófitas aquáticas, sobretudo no tempo de decomposição 14 dias.

Basidiomycota foi o grupo com maior quantidade de isolados com boa atividade enzimática, possuindo representantes em todas as enzimas testadas (à exceção da celulase). Alguns isolados foram bons degradadores de mais de um substrato: *Bullera pseudoalba* (DEC 08), produtor de lipase e esterase; *Rhodotorula mucilaginosa* (DEC 39), produtor de lipase, amilase e caseinase (**Figura 41**); e *Sporobolomyces ruberrimus* (DEC 50), produtor de lipase e gelatinase. Estes isolados são bons candidatos a estudos de caracterização e purificação das enzimas produzidas. *Cryptococcus aureus* e *Sporobolomyces beijingsis*, representadas por apenas um isolado cada uma, apresentaram considerável produção de esterase e caseinase, respectivamente.

Tabela 14. Isolados com maior atividade enzimática (menores valores médios de IE) para cada substrato testado.

Grupo ou espécie	Código isolado	IE médio	Macrófita	Tempo
Tributirina				
<i>Bullera pseudoalba</i>	Dec 08	0,131	<i>S. densiflora</i>	7 dias
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	Dec 50	0,203	<i>S. alterniflora</i>	14 dias
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Dec 39	0,242	<i>S. densiflora</i>	14 dias
Tween 80				
<i>Bullera pseudoalba</i>	Dec 08	0,198	<i>S. densiflora</i>	7 dias
Grupo 17	Dec 70	0,325	<i>S. alterniflora</i>	40 dias
<i>Cryptococcus aureus</i>	Dec 34	0,344	<i>S. maritimus</i>	14 dias
Amido				
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	Dec 50	0,242	<i>S. alterniflora</i>	14 dias
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Dec 39	0,271	<i>S. densiflora</i>	14 dias
Grupo 26	Dec 27	0,276	<i>S. alterniflora</i>	14 dias
Caseína				
<i>Sporobolomyces beijngensis</i>	Dec 40	0,166	<i>S. densiflora</i>	14 dias
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Dec 60	0,174	<i>S. maritimus</i>	14 dias
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Dec 39	0,191	<i>S. densiflora</i>	14 dias
CMC				
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Dec 02	0,192	<i>S. alterniflora</i>	7 dias
Grupo 26	Dec 33	0,218	<i>S. densiflora</i>	14 dias
<i>Acremonium</i> sp.	Dec 102	0,239	<i>S. alterniflora</i>	220 dias
Gelatina				
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Dec 72	0,206	<i>S. densiflora</i>	40 dias
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Dec 66	0,232	<i>S. maritimus</i>	40 dias
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	Dec 50	0,366	<i>S. alterniflora</i>	14 dias



Figura 41. Isolado DEC 39 (*Rhodotorula mucilaginosa*) exibindo halo de produção da caseinase (colônia abaixo, à esquerda).

Os *Ascomycota* com considerável atividade enzimática foram os isolados de *Yarrowia lipolytica* oriundos de *Spartina densiflora* (DEC 72) (**Figura 42**) e de *Scirpus maritimus* (DEC 66), produtores de gelatinase, e um representante do Grupo 17 (DEC 70), isolado de *Spartina alterniflora* aos 40 dias, produtor de esterase.

Os fungos leveduriformes negros isolados dos detritos pouco decompostos de *Spartina alterniflora* (*Aureobasidium pullulans* - DEC 02) e *Spartina densiflora* (Grupo 26 - DEC 33) foram bons produtores de celulase. Um outro representante do Grupo 26 (DEC 27), isolado dos detritos de *S. alterniflora* aos 14 dias, foi bom produtor de amilase (**Figura 43**).

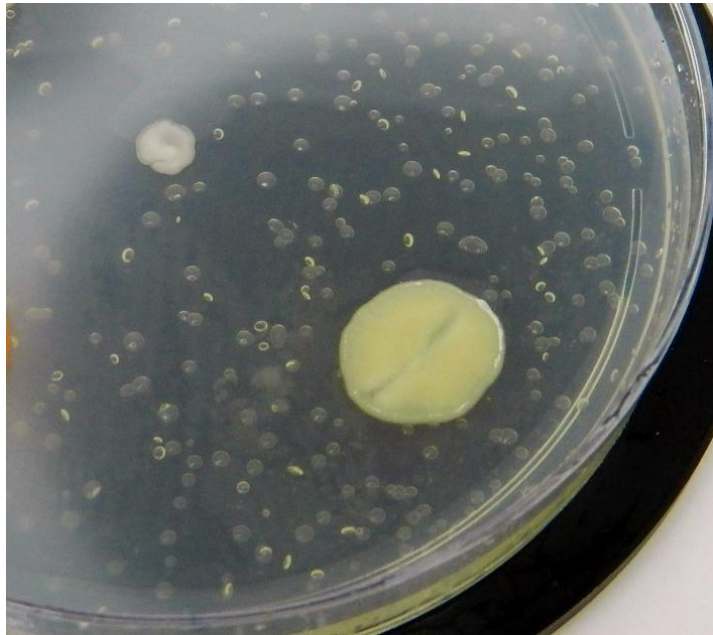


Figura 42. Isolado DEC 72 (*Yarrowia lipolytica*) exibindo halo de produção da gelatinase.



Figura 43. Isolado Dec 27 exibindo halo de produção da amilase.

Os fungos leveduriformes brancos (*Acremonium* sp.) apresentaram apenas um isolado com boa atividade enzimática. DEC 102, isolado dos detritos de *Spartina alterniflora* aos 40 dias de decomposição. Foi bom produtor de celulase (**Figura 44**).

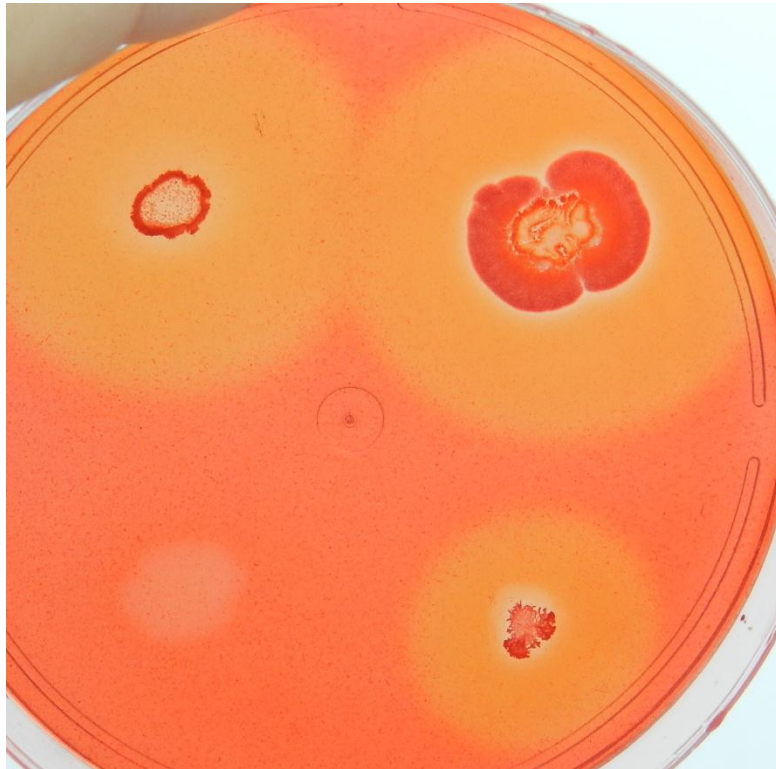


Figura 44. Isolado DEC 102 (*Acremonium* sp.) exibindo halo de produção da celulase.

7 DISCUSSÃO

7.1 DECOMPOSIÇÃO VERSUS DIVERSIDADE ASSOCIADA

Utilizando o método dos “*litter bags*”, Hickenbick e colaboradores (2004) e Silveira (2013) também analisaram a decomposição das mesmas espécies de macrófitas no local do estudo presente (*Scirpus maritimus*, *Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora*). Ambos os estudos prévios observaram o maior percentual de decaimento em *Spartina alterniflora* (73 e 65%), e os valores mais baixos em *Spartina densiflora* (49,26 e 35%). Valores estes discordantes das maiores taxas aqui observadas, o que corrobora com a perda acidental do material dos “*litter bags*” de *S. densiflora*. Mais de 60% da perda de massa de *S. alterniflora* ocorreu nos últimos 100 dias do ensaio, enquanto nos outros trabalhos a maior decomposição dos detritos foi observada nos primeiros 30 dias. A decomposição inicial também foi responsável por mais da metade da perda de massa de *Spartina* no trabalho de Newell e Porter (2000). As distintas datas e configurações entre os agentes ambientais (precipitação e salinidade, principalmente) destas pesquisas podem estar relacionadas aos diferentes padrões evidenciados. *Scirpus maritimus* tem o talo bastante suculento e é rica em compostos lábeis (HICKENBICK et al., 2004). Frações remanescentes destes compostos podem ter sido preferencialmente decompostas antes dos compostos estruturais da espécie, colaborando para seu reduzido decaimento (17,56% no total).

Assumindo-se que a quantidade de N corresponde à integridade e qualidade do material vegetal, os resíduos de *Spartina alterniflora* foram aqueles com maior qualidade nutricional, seguido por *Spartina densiflora* e, por

último, por *Scirpus maritimus*. Os detritos apresentaram reduções na carga de N até o período 40 dias, havendo um enriquecimento em N aos 100 e 220 dias. Já em *S. densiflora* o aumento da carga de N só se deu aos 220 dias. Estas mudanças corresponderam a períodos nos quais houve um crescimento e uma redução da carga de leveduras, e também a desaceleração da perda de massa seguida pelo aumento abrupto da mesma (**Figuras 15, 16 e 18**). Porém as maiores taxas de decomposição foram observadas em períodos de declínio da comunidade de leveduras (100 e 220 dias). Sabe-se que os fungos associados aos fragmentos vegetais são capazes de imobilizar N inorgânico e convertê-lo à biomassa, reduzindo a proporção C:N e concentrando nutrientes sob os detritos, aumentando desta forma o seu valor nutricional (FELL; NEWELL, 1981; ENRIQUEZ, 1993; VYMAZAL, 1995; NEWELL ET AL., 1996; CHIMNEY, 2006; SANMARTÍ; MENENDÉZ, 2007). Acredita-se que o aumento na carga de N no final do experimento esteja vinculado à atuação dos fungos filamentosos, microrganismos não avaliados no presente estudo, que também podem ter sido mais efetivos sob a redução da massa dos detritos.

Assim como nos resultados encontrados por Silveira (2012), num estudo realizado com fungos filamentosos, aqui a maior diversidade de leveduras não esteve associada com a decomposição dos detritos (perda de massa) (dados não mostrados). Neste mesmo trabalho, que comparou a colonização fúngica entre as mesmas espécies de macrófitas aqui analisadas, a diversidade de espécies foi maior em *Scirpus maritimus* (principalmente nos tempos de decomposição equivalentes a 7 e 100 dias); seguida por *Spartina alterniflora* (maior diversidade no tempo equivalente a 40 dias) e *Spartina densiflora* (maior diversidade nos tempos equivalentes a 14 e 100 dias).

No presente estudo, a maior riqueza de espécies foi encontrada em *Spartina alterniflora* (n = 15), enquanto as demais macrófitas apresentaram a mesma riqueza de espécies (n = 12). Todas as amostras de *Scirpus maritimus* evidenciaram a mesma riqueza de espécies (n = 4) (menos o tempo 220 dias, n = 3). Houve a presença de espécies de leveduras relacionadas a determinadas macrófitas: e. g. *Candida zeylanoides* em *S. maritimus*, *Pichia spartinae* em *S. alterniflora*; e *Sporobolomyces beijingsis* em *S. densiflora*. Entre as associações demonstradas, a única levedura que tem essa interação reportada na literatura é *P. spartinae* (AHEARN et al., 1970; MEYERS et al., 1975). Também houve aquelas espécies associadas entre si e presentes em períodos característicos: *Tremella* sp. aos 7 dias; *Bullera pseudoalba* e *Cryptococcus* sp. aos 7 e 14 dias; *Yarrowia lipolytica* e Grupo 17 aos 40 dias; *Aureobasidium pullulans* e Grupo 18 aos 100 dias; e *Acremonium* sp. aos 220 dias.

Poucas foram as espécies dominantes (presentes em pelo menos 3 dos períodos analisados): *Acremonium* sp. (*Scirpus maritimus*), *Aureobasidium pullulans* (*Scirpus maritimus* e *Spartina alterniflora*) e *Rhodotorula mucilaginosa* e *Sporobolomyces ruberrimus* (*Spartina densiflora*). À exceção do tempo 14 dias, marcado pela alta diversidade associada aos detritos de *Spartina* (n = 10 em *S. alterniflora* e n = 9 em *Spartina densiflora*), todos os demais tempos apresentaram um reduzido número de espécies. Aparentemente, há a competição entre as espécies neste período.

Praticamente metade das espécies/grupos encontrados (n = 10) teve ocorrência única, aparecendo somente em uma amostra ("litter bag"). Tal padrão corrobora com o modelo que vem sendo descrito para comunidades de fungos do filoplano: há rápidas sucessões, com mudanças dramáticas na

composição específica, e alta frequência de taxas temporários, principalmente na decomposição inicial das folhas (VOŘÍŠKOVÁ; BALDRIAN, 2013).

Hickenbick e colaboradores (2004) verificaram semelhanças na decomposição dos detritos de *Scirpus maritimus* e *Spartina alterniflora*, atribuindo o fato à constituição do parênquima aerífero e à grande área superficial de ambas as espécies. Tal analogia não foi encontrada no presente trabalho. Silveira (2012) também não observou este padrão e sugeriu que isto se deva às diferenças entre a composição específica associada a cada planta e também a interações com espécies de microrganismos não isolados. O presente estudo observou maiores dissimilaridades entre a diversidade associada à *Scirpus maritimus* e às espécies de *Spartina*. A maior parte dos trabalhos com fungos colonizadores de plantas não consegue traçar um padrão de sucessão ao longo da decomposição vegetal, visto a complexidade do processo por si só (BUCHAN et al., 2003; VOŘÍŠKOVÁ; BALDRIAN, 2013).

7.2 DECOMPOSIÇÃO VERSUS PERFIL ENZIMÁTICO

As leveduras associadas aos detritos das macrófitas foram mais eficientes (demonstraram reduzidos valores de IE) na produção de celulase e lipase. Tal resultado é esperado para substratos como partículas vegetais, pois estes são compostos majoritariamente por celulose. Os lipídios estão presentes em frações menores, mas são componentes principais da bainha e da cera protetora das folhas, barreiras primordiais a serem rompidas para se acessar as células vegetais e delas obter nutrientes.

A produção majoritária de celulases já foi reportada para ascomicetos oriundos de plantas aquáticas (ABDEL-RAHEEM; SHEARER, 2002). Amostras

de fungos marinhos também foram testados quanto a produção desta enzima, e verificou-se que 80% das espécies testadas apresentaram atividade de celulase (RAGHUKUMAR et al., 1994). As mesmas enzimas testadas no presente trabalho (lipase, amilase, celulase e protease) foram investigadas em dezenove espécies de fungos filamentosos aquáticos, que também revelaram a celulase e a lipase como principais enzimas produzidas (ABDULLAH, TAJ-ALDEEN, 1988). As leveduras marinhas também já foram investigadas e testadas quanto à capacidade de produzir lipases e degradar óleo cru, propriedade que pode ser aplicada em ações de biorremediação em ambientes naturais impactados por derrames de petróleo e derivados (WANG et al., 2007).

As leveduras associadas aos detritos de macrófitas aquáticas demonstraram maiores atividades enzimáticas nos detritos em decomposição inicial (7 e 14 dias). Amilase e caseinase também aparentaram bons índices de atividade aos 100 dias de decomposição, bem como a gelatinase aos 40 dias (**Figura 35**).

Já é sabido que a composição das plantas pode afetar a decomposição e, também, a habilidade enzimática dos microrganismos decompositores (VOŘÍŠKOVÁ et al., 2011). Amido e gelatina (além de celulose) foram os principais compostos degradados pelos fungos associados à macrófita *Typha latifolia* (SCHULZ; THORMANN, 2005). A degradação da gelatina está ligada à capacidade dos microrganismos utilizarem substratos ricos em compostos nitrogenados. Os detritos de *Spartina alterniflora* (espécie melhor decomposta e com maior diversidade de leveduras associadas no presente estudo) são compostos por uma gama de ácidos graxos, principalmente aqueles com

cadeia de 15 C (SCHULTZ; QUINN, 1973), e por cerca de 7% de proteínas (SQUIERS; GOOD, 1974).

A comunidade de leveduras foi dominada por *Basidiomycota*, mas apenas dois isolados deste grupo apresentaram capacidade de produzir celulase: *Cryptococcus aureus* e um representante do Grupo 17 (DEC 76). *Aureobasidium pullulans* foi a espécie com atividade celulolítica majoritária sob os detritos das macrófitas: quase 70% dos isolados apresentaram IE < 0,4. Porém, *Basidiomycota* aparentou melhor atividade lipolítica do que *A. pullulans*: 42,32% contra 28% dos isolados exibiram IE < 0,4.

Apesar de diversos isolados terem demonstrado a habilidade de degradar os substratos testados, os índices de melhor atividade enzimática foram observados nas leveduras colonizadoras dos detritos em fase de decomposição inicial (principalmente 14 dias) (**Tabela 12**). Além disso, o período inicial (até 40 dias) foi assinalado pelo aumento no número de leveduras contabilizadas e pela depleção de N dos detritos. A comunidade de leveduras e fungos leveduriformes não teve aparente influência na perda de massa dos detritos, mas a atividade enzimática dos isolados obtidos e a variação na carga de N sugerem que estes estejam ativos na transformação da matéria orgânica, o que certamente afeta a atuação de outros microrganismos mais efetivos, os quais não foram o foco deste trabalho.

7.2 DIVERSIDADE VERSUS POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Ponderando-se que ambos os fungos leveduriformes isolados neste estudo pertencem à divisão *Ascomycota* (*Acremonium* sp. e *Aureobasidium pullulans*), admite-se a homogeneidade da comunidade de leveduras e “yeast-

like” colonizadores dos detritos das macrófitas: obtiveram-se 52 isolados de *Basidiomycota* e 54 isolados de *Ascomycota*. Ascomicetos são os fungos filamentosos decompositores majoritários em macrófitas aquáticas (GESSNER, 1980; NEWELL, 1996; 2001 a; 2001 b; NIKOLCHEVA; BARLÖCHER, 2003; VIJAYKRISHNA et al., 2006; SHEARER et al., 2007; BUESING et al., 2009; SILVEIRA, 2012; PANNO et al., 2013). Os 45 isolados de fungos leveduriformes obtidos neste estudo pertenceram a esta divisão. Já os estudos com leveduras planctônicas demonstram a predominância de leveduras basidiomicéticas (JONES, 2009; HAGLER et al., 2010). De fato, nos detritos das macrófitas, as leveduras “verdadeiras”, em sua maioria, foram basidiomicéticas: n = 52 *versus* n = 16 (leveduras ascomicéticas, excluindo-se os isolados de fungos leveduriformes).

Acremonium foi um dos fungos mais representativos da micobiota associada à *Posidonia oceanica*, uma espécie de grama marinha que tolera altas salinidades. A atividade de lacases, peroxidases e tanases foi detectada nestes isolados (PANNO et al., 2013). Silveira (2012) também isolou *Acremonium* nos detritos de *Scirpus maritimus* nos tempos 90 e 180 dias, o que corrobora com a maior participação destes fungos na decomposição tardia das plantas. Algumas espécies do gênero são patogênicas de plantas aquáticas (SHEARER, 2010; MOLO; OGWANG, 2012), de cultivares comerciais como o morango (RACEDO et al., 2013) e já foram relatadas até mesmo espécies de *Acremonium* patogênicas humanas (PURNAK et al., 2011).

Aureobasidium pullulans demonstrou associações com as espécies de *Basidiomycota* *Sporobolomyces ruberrimus* e *Meyerozyma guilliermondii*. *A.*

pullulans e *S. ruberrimus* foram categorizadas como espécies transientes da madeira em decomposição, pois tiveram baixa abundância neste substrato (inferior a 4%) (YURKOV et al., 2010). Ambas as espécies foram mais representativas na decomposição das macrófitas aquáticas, não podendo ser classificadas como transientes neste processo. *A. pullulans* esteve presente em todos os tempos em *Scirpus maritimus*; em 7, 14 e 100 dias em *Spartina alterniflora*; e em 14 e 100 dias em *Spartina densiflora*, sempre em percentuais consideráveis (**Figura 22**). *S. ruberrimus* foi amostrada como a espécie mais representativa dos detritos de *S. alterniflora* aos 14 dias e marcou presença aos 14, 40 e 100 dias em *S. densiflora* (**Figuras 27, 28 e 29**).

Aureobasidium pullulans e *Meyerozyma guilliermondii* são espécies comumente isoladas da superfície de frutos, estando associadas a sua deterioração; e.g. maçã e pera (PELICCIA et al., 2011) e ameixa (VADKERTIOVÁ et al., 2012). No presente estudo, *A. pullulans* e *M. guilliermondii* estiveram presentes em associação nos detritos de *Scirpus maritimus* aos 14 dias de decomposição (**Figura 27**). *M. guilliermondii* também tem sido isolada do endofítion de *Solanum cernuum* (VIEIRA et al., 2011), de madeira podre da floresta Atlântica (MORAIS et al., 2013) e de águas superficiais (BIEDUNKIEWICZ; BARANOWSKA, 2010). A espécie aparenta ter atividade fungistática e é capaz de produzir as enzimas β -1,3-glucanase e etil acetato, componente este utilizado na produção de essências (CODA et al., 2013). O único isolado de *M. guilliermondii* foi hábil a produzir lipase e caseinase em poucas quantidades médias (IE de ambas enzimas = 0,63).

Diferentes cepas de *Aureobasidium pullulans* podem produzir amilase, proteinase, lipase, celulase, xilanase, mananase, transferases, pululana,

sideróforos e uma variedade de outras proteínas e genes codificantes que vêm sendo clonados para fins biotecnológicos (CHI et al., 2009). Representantes de *A. pullulans* obtidos neste estudo foram hábeis a degradar todos os substratos testados. Os melhores índices foram para as enzimas celulase e lipase. Os isolados de *A. pullulans* oriundos de macrófitas aquáticas apresentaram reduzida atividade de amilase, esterase e gelatinase, tendo apenas um único isolado a capacidade de degradar caseinase (DEC 02).

Pichia spartinae é uma levedura com associação específica por *Spartina alterniflora*. Tal espécie parece ter afinidade por detritos em decomposição tardia, pois também foi duplamente isolada de fragmentos nestas condições por Buchan e colaboradoras (2002) (aqui foi encontrada colonizando os detritos desta planta aos 220 dias). *P. spartinae* é relatada na literatura por sua atividade de assimilar metais traço (Fe II e III) (CATALLO et al., 1996), fato que põe os microrganismos associados às macrófitas como os principais agentes da depurativos de efluentes e cargas poluentes em ambientes aquáticos. Além disso, *P. spartinae* é reconhecida como produtora de ácido indol acético, um importante promotor de crescimento das plantas (NAKAMURA et al., 1991). Aqui, *P. spartinae* produziu apenas lipases e celulases, mas demonstrou índices enzimáticos insatisfatórios (0,7 e 0,58, respectivamente).

Um representante do complexo *Candida pseudointermedia* / *Candida intermedia* foi isolado dos detritos de *Scirpus maritimus* em decomposição inicial (7 dias). Leveduras destas espécies tem sido isoladas desde amostras ambientais, e.g. lagoas (ROSA et al., 1995) e substratos naturais da Amazônia (NEVES et al., 2006), até de alimentos, e.g. queijos (TZANETAKIS et al., 1998;

PEREIRA-DIAS et al., 2000). A cepa de *C. intermedia* PYCC 4715 apresenta altas taxas de transporte de xilose, característica interessante para processos de fermentação industrial, principalmente de materiais ricos em celulose (GÁRDONYI et al., 2003). *C. intermedia* também apresenta tolerância a diferentes metais (atividade de catalases, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase) (FUJS et al., 2005). Numa seleção de isolados com melhor atividade proteolítica realizada por Neves e colaboradores (2006), *C. intermedia* foi a levedura mais eficiente. O isolado obtido no presente estudo apresentou baixa atividade lipolítica, mas não apresentou produção de protease.

Candida zeylanoides ocorreu somente em uma amostra de *Spartina alterniflora*. A espécie também foi pouco abundante em um estudo realizado com 25 espécies de plantas (GLUSHAKOVA; CHERNOV, 2010). Vem sendo isolada de diversos tipos de planta, como em cultivares de cana (na qual também foi pouco frequente e abundante) (DE AZEREDO et al., 2010) e de milho (sendo uma das espécies mais representativas neste substrato (NOUT et al., 1997), e de troncos de árvore em decomposição (RHANDAWA et al., 2001). Também já foi isolada de amostras de água estuarina (COELHO et al., 2010) e das algas *Polisiphonia* e *Chondrus* (SESHADRI; SIEBURTH, 1971). A espécie destaca-se no campo da biotecnologia pelo potencial de descoloração de corantes sintéticos (DEAK et al., 2000) e na formação de aromas (PURRIÑOS et al., 2012). No presente trabalho, apresentou atividade lipolítica pouco expressiva ($IE_{\text{tributirina}} = 0,46$ e $IE_{\text{tween 80}} = 0,59$).

Yarrowia lipolytica tem sido isolada comumente de alimentos (BARTH; GAILLARDIN, 1997), mas também vem sendo detectada em estuários

(SILVEIRA, 2012) e em habitats hipersalinos (BUTINAR et al., 2006) e ocasionalmente demonstra associações com plantas (ZVYAGILSKAYA et al. 2001). Tal levedura é muito estudada pela capacidade de utilizar alcanos, ácidos graxos e óleos, sendo aplicada no tratamento de efluentes ricos em gorduras (FICKERS et al., 2006). Os isolados da espécie oriundos dos detritos de macrófitas apresentaram atividade enzimática baixa para a produção de esterases (IE > 0,62), mediana para a produção de lipases (0,4 < IE < 0,5), e alta para gelatinase (maior parte com 0,2 < IE < 0,4).

As leveduras basidiomicéticas são ubíquas de diversos habitats marinhos, mas são usualmente consideradas alóctones, especialmente porque muitas leveduras desta divisão estão frequentemente associadas ao filoplano das plantas (terrestres e aquáticas) (HAGLER; AHEARN, 1987; LACHANCE; STARMER, 1998). *Sporobolomyces* e *Bullera* (gêneros que estiveram associados com os detritos de *Spartina* aos 14 dias) são habitantes típicos do filoplano (NAGAHAMA, 2006), mas já foram encontrados em amostras do oceano Pacífico, com frequências mais altas quanto mais distante da costa foram realizadas as amostragens (HERNANDEZ-SAAVEDRA et al. 1992). Tais fatos levam a crer que ambos os gêneros sejam indígenas de habitats marinhos (NAGAHAMA, 2006).

Sporobolomyces e *Bullera* foram extensivamente isolados do filoplano de plantas da região costeira do Pacífico asiático (NAKASE, 2000). Uma espécie de *Bullera* (*B. singularis*) é capaz de produzir β -galactosidase de interesse comercial (CHO et al., 2003). Os isolados de *B. pseudoalba* oriundos das macrófitas foram hábeis a produzir lipases e esterases com bons índices de atividade enzimática, inclusive sendo um representante desta espécie o

melhor produtor destas enzimas dentre todos os isolados obtidos. Também apresentaram bons índices de atividade para amilase ($IE < 0,4$).

Sporobolomyces ruberrimus é extensivamente isolada do filoplano (INÁCIO et al., 2010), mas também vem sendo observada em ambientes de geleiras (DE GARCÍA et al., 2010; 2012). A espécie apresenta a habilidade de catalisar reações de esterificação e é aplicada em estudos de produção e caracterização da atividade de lipases (FERRAZ et al., 2012), também sendo aproveitada pela indústria de pigmentos (RAZAVI et al., 2006). No presente estudo, os isolados de *S. ruberrimus* foram hábeis a degradar todos os substratos testados (menos CMC). A atividade enzimática mais expressiva foi das lipases (maior parte dos $IE < 0,27$); seguida por amilase, caseinase, esterase e, por último, gelatinase.

Obteve-se um único isolado da espécie *Sporobolomyces beijingensis* dos detritos de *Spartina alterniflora*, aos 14 dias. Trata-se de uma espécie recentemente descrita, associada ao filoplano de diversas espécies de plantas da China (WANG; BAI, 2006). A espécie também já foi isolada do mosto de uva (SUN et al., 2009). O isolado degradou todos os substratos, à exceção da CMC, apresentando a maior atividade enzimática para caseinase dentre todos os isolados ($IE = 0,16$).

Rhodotorula mucilaginosa vem sendo considerada uma das espécies prevalentes em ambientes aquáticos (NAGAHAMA, 2006). Silveira (2012) isolou esta levedura em amostras de água do estuário da Lagoa dos Patos. Coelho e colaboradores (2010) reportaram a espécie como majoritária em ambientes estuarinos. Foi a espécie dominante em efluente com altas concentrações de sal (LAHAV et al., 2002) e em lagos oligotróficos da

Patagônia (LIBKIND et al. 2003). Também foi reportada como dominante na filosfera de árvores *Sphagnum* (KACHALKIN; YURKOV, 2012), em troncos em decomposição (RHANDAWA et al., 2001) e em mais de mil amostras de árvores do Canadá (MAGANTI et al., 2011). A espécie comumente coloniza frutas (MACIEL et al., 2012) e é utilizada como biocontrole de pragas (GHOLAMNEJAD et al., 2009; LI et al., 2011). A espécie foi prevalente nos detritos das macrófitas em alguns determinados períodos: aos 7 dias em *Scirpus maritimus* e aos 100 dias em *Spartina densiflora*, marcando presença em menor escala nos detritos de *Spartina alterniflora* (aos 7 e 14 dias). Além de ser aplicada na síntese de pigmentos carotenóides (MOLINÉ et al., 2012), também produz uma esterase de interesse industrial (acetil xilana esterase livre de atividade xilanolítica (LEE et al., 1987). Os isolados de *R. mucilaginosa* provenientes das macrófitas em decomposição produziram todas enzimas testadas, exceto celulase. Os melhores valores de atividade enzimática foram observados para caseinase (DEC 60, um isolado *R. mucilaginosa*, teve destacada produção desta enzima), amilase e lipase.

Cryptococcus foi representado por isolados não identificados em nível de espécie e por *Cryptococcus cellulolyticus/Bullera pseudoalba* e *Cryptococcus aureus*. O gênero foi representado nas três macrófitas avaliadas e colonizou os detritos até o tempo de decomposição 40 dias (decomposição inicial a intermediária) (**Figuras 27, 28 e 29**). *Cryptococcus* é dominante em ambientes aquáticos tropicais (HAGLER et al., 2010) e esteve presente em mais da metade das amostras de um trabalho realizado com sucessão de leveduras epifíticas em 25 espécies de plantas (GLUSHAKOVA; CHERNOV, 2010). Isolados do complexo *Cryptococcus cellulolyticus / Bullera pseudoalba*

são comumente associados a substratos vegetais, como e. g. as raízes das plantas *Vicia hirsuta* e *Trifolium pratense* (Fabaceae) (RENKER et al., 2004). Os isolados deste complexo oriundos das macrófitas foram hábeis a produzir lipase e caseinase, porém não houve índices expressivos. Um isolado de *Cryptococcus aureus* foi obtido dos detritos de *Scirpus maritimus* aos 14 dias, apresentando alta atividade lipolítica (IE_{lipase} = 0,247 e IE_{esterase} = 0,3) e baixa atividade celulolítica (IE_{celulase} = 0,6). *C. aureus* vem sendo isolado de amostras marinhas (CHI et al., 2010) e é conhecido por produzir inulinase, uma enzima importante para a produção de frutose a partir da hidrólise de inulina (SHENG et al., 2008)

Os isolados identificados como *Tremella* sp. apresentaram sequências com similaridade abaixo de 95% em relação àquelas já depositadas no banco de dados do GenBank, tratando-se de uma possível nova espécie. Os isolados aqui obtidos (n= 2) foram oriundos dos detritos de *Spartina densiflora* (DEC 12) e de *Scirpus maritimus* (DEC 24), ambos aos 7 dias de decomposição. Espécies deste gênero são habitualmente isoladas de fragmentos de madeira em decomposição (LAURSEN et al., 2005; TORTELLA et al., 2008). *Tremella* sp. é explorada na indústria pela produção de polissacarídeos, principalmente glucuronoxilomananas, aplicadas na medicina para aumentar as defesas imunes de pacientes imunocomprometidos (DE BAETS; VANDAMME, 2001). Além disso, podem produzir metabólitos que auxiliam na degradação de pesticidas da classe do DDT (clorofenóis) (TORTELLA et al., 2008; SUHARA et al., 2011). Os isolados de *Tremella* deste estudo produziram lipase e caseinase com índices enzimáticos pouco expressivos (IE \geq 0,7).

Muitas das espécies aqui isoladas não são comumente citadas na literatura como associadas a detritos em decomposição e raros são os estudos descrevendo a colonização de macrófitas aquáticas por leveduras - maior parte destes está focada em bactérias e fungos filamentosos. Os substratos utilizados para testar o potencial biotecnológico das leveduras aqui obtidas são generalistas, podendo ser alvo de diferentes conjuntos de enzimas mais específicas, de uma mesma classe (lipases, proteases ou polissacarases), cuja caracterização e identificação dependem de análises mais refinadas. Mesmo assim, estudos prévios como este se fazem necessários para selecionar microrganismos com características especialmente desejadas. Nossos dados sugerem que as leveduras decompositoras de macrófitas aquáticas são boas fontes de genes para uso biotecnológico, pois diversas espécies apresentaram capacidade de consumir mais de um dos substratos testados, exibindo halos de degradação com dimensões até mesmo maiores do que as de suas próprias colônias. Muitos isolados demonstraram habilidades enzimáticas distintas daquelas já reportadas na literatura. Além disso, o fato de termos encontrado uma possível espécie nova de *Tremella* agrega ainda mais valor aos estudos em ambientes ainda pouco explorados.

8 CONCLUSÕES

- *Spartina alterniflora*, foi a espécie melhor decomposta e com maior diversidade de leveduras e fungos leveduriformes associados, o que provavelmente está ligado ao maior teor de N de seus detritos;

- dentre as variáveis ambientais analisadas, a salinidade pareceu ter maior relação com a quantidade de leveduras colonizadoras dos detritos;

- a quantidade, a diversidade e a sucessão de leveduras variaram conforme a espécie de macrófita e o tempo de decomposição analisados, mas não aparentaram estar relacionadas às taxas de perda de massa;

- outros grupos de microrganismos não analisados no presente estudo, devem atuar de modo mais significativo na redução da massa dos detritos das macrófitas aquáticas;

- em todas as macrófitas, a maior diversidade de leveduras foi verificada aos 14 dias de decomposição, sugerindo-se que este período, diferentemente dos outros, é marcado pela competição entre as espécies de leveduras e fungos leveduriformes colonizadores;

- algumas espécies de leveduras e fungos leveduriformes foram mais representativas, tanto pela frequência quanto pela atividade enzimática: *Acremonium* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Bullera pseudoalba*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces ruberrimus* e *Yarrowia lipolytica*;

- o isolamento de uma possível nova espécie de *Tremella* demonstra o valor que estudos em ambientes pouco explorados têm para aumentar o conhecimento da biodiversidade;

- a quantidade de isolados produtores de enzimas foi variável para cada substrato testado, sendo maior a quantidade de microrganismos produtores de lipase, em segundo lugar de proteases, e, em terceiro lugar, de polissacarases;

- a maior atividade enzimática foi verificada no período de decomposição inicial dos detritos (7 e 14 dias), tendo as lipases de *Basidiomycota* e as celulasas de *Aureobasidium pullulans* apresentado os índices mais expressivos;

- os tempos 7 e 14 dias não revelaram as mais altas taxas de decomposição, mas sugere-se que a alta atividade enzimática observada neste período é crucial para a liberação de nutrientes e para o desenvolvimento de outros microrganismos, mais efetivos sob a redução da massa dos detritos;

- não foi clara a diferenciação entre a produção e atividade enzimática de isolados de diferentes espécies de macrófitas, mas a maior parte dos substratos foi mais bem degradada por isolados dos tempos 7 e 14 dias, à exceção de gelatina, caseína e amido, que foram degradadas com bons índices por isolados dos tempos 40 e 100 dias;

- alguns isolados degradaram diferentes substratos com boa atividade enzimática e poderiam ser aplicados a estudos futuros de caracterização e produção destas enzimas em larga escala.

9 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABDEL-RAHEEM, A.; SHEARER, C. A. Extracellular enzyme production by freshwater ascomycetes. *Fungal Diversity*, v. 11, p. 1-19. 2002.

ABDULLAH, S. K. et al. Extracellular enzymatic activity of aquatic and aero-aquatic conidial fungi. *Hydrobiologia*, v. 174, n. 3, p. 217-223, 1989.

ADRIO, J. L.; DEMAIO, A. L. Fungal biotechnology. *International Microbiology*, v. 6, p. 191-199, Jul. 2003.

ALLAN, J.D. Stream Ecology. Structure and function of running waters. London: Chapman & Hall, 1996.

ALEXANDER, M. Introduction of soil microbiology. John Willey and Sons, New York, 467 p. 1977.

AM-IN, S., LIMTONG, S.; YONGMANITICHAI, W.; JINDAMORAKOT, S. *Candida andamanensis* sp. nov., *Candida laemsonensis* sp. nov. and *Candida ranongensis* sp. nov., anamorphic yeast species isolated from estuarine waters in a Thai mangrove forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 61, n. 2, p. 454-461, Feb. 2011.

ANDREWS, J. H; HARRIS, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Reviews Phytopathology*, v. 38: p. 145-180, 2000.

APRILE, F. M.; DELITTI, W. B.; BIANCHINI, Jr. Proposta de modelo cinético da degradação de laminados de madeiras em ambientes aquatic e terrestre. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 59, n. 3, p. 493-501, 1999.

ATALLA, R. H. The role of hemicelluloses in the nanobiology of wood cell walls. In: *Proceedings of the Hemicelluloses Workshop*. The Wood Technology Research Centre, University of Canterbury, Christchurch, NZ. p. 37-57. Jan. 2005.

ATLAS, R.M. AND PARKS, L.C. **Handbook of Microbiological Media**. London: CRC Press, 1993.

BAKER, R.; FRY, B.; ROZAS, L. P; MINELLO, T. J. Hydrodynamic regulation of salt marsh contributions to aquatic food webs. *Inter-Research Marine Ecology Progress Series*, v. 490, p. 37-52, Set. 2013.

BALDRIAN, P.; VALÁSKOVÁ, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 32, p. 501-521. Mar. 2008.

BAPTISTA, J. C. et al. Mutation in the xpsD gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence. *Genetics and Molecular Biology*, Brasil, v. 33, n. 1, p. 146-153, Abr. 2010.

BARKER, J. S. F.; TOLL, G. L.; EAST, P. D.; MIRANDA, M.; PHAFF, H. J. Heterogeneity of the yeast flora in the breeding sites of cactophilic *Drosophila*. ***Canadian Journal of Microbiology***, v. 29, p. 6-14, Jan. 1983.

BÄRLOCHER F.; KENDRICK, B. Dynamics of the fungal population on leaves in a stream. ***Journal Ecology***, v. 62, p. 761-791, 1974.

BATTLE, J. M.; MIHUC, T. B. Decomposition dynamics of aquatic macrophytes in the lower Atchafalaya, a large floodplain river. ***Hydrobiology***, v. 418, p. 123-136. 2000.

BECK-NIELSEN, D.; MADSEN, T. V. Occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in aquatic macrophytes from lakes and streams. ***Aquatic Botany***, v. 71, p. 141-148, 2001.

BEHRENS S. et al. In situ accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains Bacteria, Archaea, and Eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes. ***Applied Environmental Microbiology***, v. 69, p. 1748-1758, 2003.

BELOVA, M. Microbial decomposition of freshwater macrophytes in the littoral zone of lakes. ***Hydrobiologia***, v. 251, n. 1-3, p. 59-64, Fev. 1993

BENGTSSON, G. Interactions between fungi, bacteria and beech leaves in a stream microcosm. ***Oecologia***, v. 89, p. 542-549, 1992.

BENNER, R.; NEWELL, S. Y.; MACCUBBIN, A. E.; HODSON, R. E. Relative contributions of bacteria and fungi to rates of degradation of lignocellulosic detritus in salt-marsh sediments. ***Applied and Environmental Microbiology***, v. 48, n. 1, p. 36-40, Jul. 1984.

BENNER, R.; MORAN, M. A.; HODSON, R. E. Biogeochemical cycling of lignocellulosic carbon in marine and freshwater ecosystems: relative contributions of prokaryotes and eukaryotes. ***Limnological Oceanography***, v. 31, p. 89-100, 1986.

BERGBAUER, M.; MORAN, M. A.; HODSON, R. E. Decomposition of lignocellulose from a freshwater macrophyte by aero-aquatic fungi. ***Microbial Ecology***, v. 23, n. 2, p. 159-167, 1992.

BERMINGHAM, S.; DEWEY, F.; MALTBY, L. Development of a monoclonal antibody-based immunoassay for the detection and quantification of *Anguillospora longissima* colonizing leaf material. ***Applied Environmental Microbiology***, v. 61, p. 2606-2613, 1995.

BHADAURIA, V.; POPESCU, L.; ZHAO, W.; PENG, Y. Fungal transcriptomics. ***Microbiology Research***, v. 162, p. 285-298, 2007

BIANCHINI JR., I.; CUNHA-SANTINO, M. B. As rotas de liberação do carbono dos detritos de macrófitas aquáticas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 1, p. 20-29, 2008.

BIANCHINI JR., I. Modelos de crescimento e decomposição de macrófitas aquáticas. In: THOMAZ, S. M.; BINI, L. M. (Eds.) *Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas*. Maringá: EDUEM, 2003. p. 85-126.

BIANCHINI JR., I. Aspectos do processo de decomposição nos ecossistemas aquáticos continentais. In: POMPÊO, M. L. M. (Ed.) *Perspectivas na Limnologia do Brasil*. Marinhão: Editora União, 1999. Cap. 2.

BIDDANDA, B.; OPSAHL, S.; BENNER, R. Plankton respiration and carbon flux through bacterioplankton on the Louisiana shelf. **Limnological Oceanography**, v. 39, n. 6, p. 1259-1275, 1994.

BITAR, A. L.; BIANCHINI JR., I. Mineralization assays of some organic resources of aquatic systems. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 557-564, 2002.

BLANCO, A.; DÍAZ, P.; ZUECO J.; PARASCANDOLA, P.; PASTOR, J.F. A multidomain xylanase from a *Bacillus* sp. with a region homologous to thermostabilizing domains of thermophilic enzymes. **Microbiology**, v. 145, p. 2163-2170, 1999.

BODELIER et al. Ecological aspects of microbes and microbial communities inhabiting the rhizosphere of wetland plants. **Wetlands and Natural Resource Management Ecological Studies**, v. 190, p. 205-238, 2006.

BREPOHL, D. C.; ABREU, P. C.; ANÉSIO, A. M. B.; COSTA, C. S. B. Variação da biomassa microbiana durante a degradação da macrófita *Scirpus maritimus* var. *macrostachyus* (Lam) Michx. **Atlântica**, v. 18, p.13-26, 1996.

BRISTOW, L. A.; JICKELLS, T. D.; WESTON, K.; MARCA-BELL, A.; PARKER, R.; ANDREWS, J. E. Tracing estuarine organic matter sources into the southern North Sea using C and N isotopic signatures. **Biogeochemistry**, v. 113, n. 1-3, p. 9-22, Mai. 2013.

BUCHAN et al. Dynamics of bacterial and fungal communities on decaying salt marsh grass. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6676-6687, Nov. 2003.

BUESING, N. Bacterial counts and biomass determination by eppifluorescence microscopy. p. 203-208. In: GRAÇA, M. A. S.; BÄRLOCHER, F.; GESSNER, M. O. (Ed.). **Methods to study litter decomposition: a practical guide**. Springer, Dordrecht, Netherlands, 2005.

BURR, F. A.; WEST, J. A. Light and electron microscope observations on the vegetative and reproductive structures of *Bryopsis hypnoides*. **Phycologia**, v. 9; p. 17-37, 1970.

BUTINAR, L.; SPENCER-MARTINS, I.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeasts in high arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of Microbiology**, v. 91, p. 277-289, 2007.

CABRAL, A. R.; CAPANEMA, M. A.; GEBERT, J.; MOREIRA, J. F.; JUGNIA, L. B. Quantifying Microbial Methane Oxidation Efficiencies in Two Experimental Landfill Biocovers Using Stable Isotopes. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 209, n. 1-4, p. 157-172, Jun. 2010.

CARLINI, C. R.; POLACCO, J. C. Toxic Properties of Urease. **Crop Science**, v. 48, n. 5, p. 1665-1672, Set. 2008.

CARREIRO, M. M. et al. Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. **Ecology**, v. 81, n. 9, p. 2359-2365, 2000.

CESAR, D. E.; ABREU, P. C. Ecology of aquatic microorganisms in Southern Brazil: state of art. In: Faria, B. M.; Farjalla, V. F.; Esteves, F. A. eds., **Aquatic Microbial Ecology in Brazil**, Series Oecologia brasiliensis, v. IX, PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro, 2001.

CHAPMAN, V. J. Studies in salt marsh ecology. I-III. **Journal of Ecology**, v. 6, n. 1, p. 144-179. Fev. 1938.

CHAND, T.; HARRIS, R. F.; ANDREWS, J. H. Enumeration and Characterization of bacterial colonists of a submersed aquatic plant, Eurasian watermilfoil (*Myriophyllum spicatum* L.). **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3374-3379, Out. 1992.

CHI, Z.M.; MA, C.; WANG, P.; LI, H.F. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 534-538, 2007.

CHISHOLM, J. R. M.; DAUGA, C.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; JAUBERT, J. M. 'Roots' in mixotrophic algae. **Nature** v. 381, p. 382, 1996.

CHRISTENSEN, K. K.; WIGAND, C. Formation of root plaques and their influence on tissue phosphorus content in *Lobelia dortmanna*. **Aquatic Botany**, v. 61, p. 111-122, 1998.

CHRÓST, R. J.; SIUDA, W.; ALBRECHT, D.; OVERBECK, J. A method for determining enzymatically hydrolyzable phosphate (EHP) in natural waters. **Limnology and Oceanography**, v. 31, p. 622-667, 1986.

CIMINO, M.; ALAMO, L.; SALAZAR, L. Permeabilization of the mycobacterial envelope for protein cytolocalization studies by immunofluorescence microscopy. **BMC Microbiology**, v. 6, p. 35, 2006.

CLAYTON, J. S.; BAGYARAJ, D. J. Vesicular-arbuscular mycorrhizas in submerged aquatic plants of New Zealand. ***Aquatic Botany***, v. 19, p. 251-262, 1984.

COCI et al. Quantitative Assessment of Ammonia-Oxidizing Bacterial Communities in the Epiphyton of Submerged Macrophytes in Shallow Lakes. ***Applied and Environmental Microbiology***, v. 76, n. 6, p. 1813-1821, Mar. 2010.

COIMBRA, F. L.; COSTA, C. S. B. Mapeamento digital dos macro-habitats de dunas e marismas da costa do Rio Grande do Sul através de imagens de satélite e fotografias aéreas. In: ***Encontro nacional de gerenciamento costeiro***, nov. 2006. Anais. São Vicente, 2006.

COLOMBO, P. M. Occurrence of endophytic bacteria in siphonous algae. ***Phycologia***, v. 17, p. 148-151, 1978.

COOKE, R. C.; RAYNIER, A. D. M. Ecology of saprotrophic Fungi. Longman, London, New York. 1984.

COPERTINO, M.; SEELIGER, U. Habitats de *Ruppia maritima* e de macroalgas. In: SEELIGER, U; ODEBRECHT, C. (Eds.). ***O Estuário da Lagoa dos Patos: Um Século de Transformações***. Rio Grande: FURG, 2010, p. 91-100.

CORRE, S.; PRIEUR, D. Density and morphology of epiphytic bacteria on the kelp *Laminaria digitata*. ***Botanica Marina***, v. 33, p. 515-523, 1990.

COSIER, C. et al. Effects of macrophytes on the fate of mercury in aquatic systems. ***Environmental Toxicology and Chemistry***, Dez. 2013. DOI: 10.1002/etc.2499.

COSTA, C. S. B.; SEELIGER, U.; OLIVEIRA, C. P. L. de. Distribuição, funções e valores das marismas e pradarias submersas no estuário da Lagoa dos Patos (RS, Brasil). ***Atlântica***, Rio Grande, v.19, p. 51-66, 1997.

COSTANZA, R. et al. The Value of Coastal Wetlands for Hurricane Protection. ***Ambio***, v. 37, n. 4, p. 241–248, Jun. 2008.

COUTO, T.; DUARTE, B.; CAÇADOR, I.; BAETA, A.; MARQUESA, J. C. Salt marsh plants carbon storage in a temperate Atlantic estuary illustrated by a stable isotopic analysis based approach. ***Ecological Indicators***, v. 32, p. 305-311, Set. 2013.

CULLEN, D. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. ***Journal of Biotechnology***, v. 53, p. 273-289, 1997.

CUNHA-SANTINO, M. B.; SCIESSERE, L.; BIANCHINI JR., I. As atividades das enzimas na decomposição da matéria orgânica particulada em ambientes aquáticos continentais. ***Oecologia Brasiliensis***, v. 12, n. 1, 2008.

CZECZUGA, B.; MAZALSKA, B.; GODLEWSKA, A.; MUSZYNSKA, E. Aquatic fungi growing on dead fragments of submerged plants. *Limnologica*, v. 35, p. 283-297, 2005.

DAS, M.; ROYER, T.; LEFF, L. Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 756-767, 2007.

DAVIS, M. W.; LAMAR, R. T. Evaluation of methods to extract ergosterol for quantification of soil fungal biomass. *Soil Biological Biochemistry*, v. 24; p. 189-198, 1992.

DAWES, C. J.; LOHR, C. A. Cytoplasmic organization and endosymbiotic bacteria in the growing points of *Caulerpa prolifera*. *Revue Algologique*, v. 13, n. 4, p. 309-314, 1978.

DELBRIDGE, L.; COULBURN, J.; FAGERBERG, W.; TISA, L. S. Community profiles of bacterial endosymbionts in four species of *Caulerpa*. *Symbiosis*, v. 37, p. 335-344, 2004.

DE MOT, R.; ANDRIES, K.; VERACHTERT, H. Comparative study of starch degradation and amylase production by ascomycetous yeast species. *Systematic and applied microbiology*, v. 5, n. 1, p. 106-118, 1984.

DELONG, E. F.; FRANKS, D. G.; ALLDREDGE, A. L. Phylogenetic diversity of aggregated-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnological Oceanography*, v. 39, p. 924-934, 1993.

DENWARD, C. M. T.; EDLING, H.; TRANVIK, L. J. Effects of solar radiation on bacterial and fungal density on aquatic plant detritus. *Freshwater Biology*, v. 41, p. 575-582, 1999.

DEPETRIS, P. J.; KEMPE, S.; LATIF, M.; MOOK, W. G. ENSO-controlled flooding in the Paraná River (1904-1991). *Naturwissenschaften*, v. 83, p. 127-129, 1996.

DUNBAR, J.; TICKNOR, L. O.; KUSKE, C. R. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied Environmental Microbiology*, v. 67, p. 190-197, 2001.

ELEUTERIUS, L. N.; ELEUTERIUS, C. K. Tide Levels and Salt Marsh Zonation. *Bulletin of Marine Science*, v. 29, n. 3, p. 394-400. Jul. 1979.

ELLIS, D.; DAVIS, S.; ALEXIOU, H.; HANDKE, R.; BARTLEY, R. Descriptions of medical fungi, 2^a Ed. Universidade de Adelaide, Adelaide, 2007.

ELLIS, M. B.; ELLIS, J. P. ***Microfungi on land plants: an identification handbook***, 1ª Ed. Macmillan, New York, 1985.

ERIKSSON, P. G. Interaction effects of flow velocity and oxygen metabolism on nitrification and denitrification in biofilms on submersed macrophytes. ***Biogeochemistry***, v. 55, p. 29-44, 2001.

ERIKSSON, P. G.; WEISNER, S. E. B. An experimental study on effects of submersed macrophytes on nitrification and denitrification in ammonium rich aquatic systems. ***Limnological Oceanography***, v. 44, p. 1993-1999, 1999.

ESPAÑA, M. et al. Assessing the effect of organic residue quality on active decomposing fungi in a tropical Vertisol using ¹⁵N-DNA stable isotope probing. ***Fungal Ecology***, v. 4, n.1, p. 115–119, Feb. 2011.

FAGERBACKE, K. M.; HELDAL, M.; NORLAND, S. Content of carbon, nitrogen, oxygen sulfur and phosphorous in native aquatic and culture bacteria. ***Aquatic Microbial Ecology***, v. 10: p. 15-27, 1996.

FALCONER, G. J.; WRIGHT, J. W.; BEALL, H. W. The decomposition of certain types of fresh litter under Field conditions. ***American Journal of Botany***, v. 20, p. 196-203. 1933.

FARACO, B. F. C.; FARACO, B. A. Poluição hídrica micológica. ***Revista Brasileira de Medicina***, v. 33, p. 210-220, 1960.

FARMER, A. M. The occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in isoetid type submerged macrophytes under naturally varying conditions. ***Aquatic Botany***, v. 21, p. 245-249, 1985.

FELL, J.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, v. 50, p.1351-1371, 2000.

FONSECA, A.; INÁCIO, J. Phylloplane Yeasts. In: Rosa, C. A.; Peter, G. eds., ***Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts***, Springer-Verlag, Berlim, 2006, p. 263-301.

FORMOSO, A. Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a macrófitas aquáticas. Dissertação (Mestrado). Porto Alegre: UFRGS [2014]. não publicado.

FRANÇA, S.; VASCONCELOS, R. P.; TANNER, S.; MÁGUAS, C.; COSTA, M. J.; CABRAL, H. N. Assessing food web dynamics and relative importance of organic matter sources for fish species in two Portuguese estuaries: A stable isotope approach. ***Marine Environmental Research***, v. 72, n. 4, p. 204-215, Oct. 2011.

FRIES, L. Some observations on the morphology of *Enteromorpha linza* (L.) J. Ag. and *Enteromorpha compressa* (L.) Grev. In axenic culture. ***Botanica Marina***, v. 18, p. 251-253, 1975.

GADANHO, M.; SAMPAIO, J. Application of temperature gradient gel electrophoresis to the study of yeast diversity in the estuary of the Tagus River, Portugal. ***FEMS Yeast Research***, v. 5, p. 253-261, 2004.

GANLEY, R. J.; BRUNSFELD, S. J.; NEWCOMBE, G. A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. ***Proceedings of the National Academy of Sciences USA***, v. 101, p. 10107-10112, 2004.

GARCÍA, V.; BRIZZIO, S.; LIBKIND, D.; ROSA, C. A.; BROOCK, M. V. *Wickerhamomyces patagonicus* sp. nov., an ascomycetous yeast species from Patagonia, Argentina. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, v. 60, n. 7, p. 1693-1696, Jul. 2010.

GEORGE, S.P.; AHMAD, A.; RAO M. B. A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp.: influence of additives on thermostability. ***Bioresource Technology***, v. 78, n. 3, p. 221-224, Jul. 2001.

GESSNER, R. V. Degradative enzyme production by salt-marsh fungi. ***Botanica Marina***, v. 23, n. 2, p. 133-139, 1980.

GESSNER, M.; GULIS, V.; KUEHN, K.; CHAUVET, E.; SUBERKROPP, K. Fungal decomposers of plant litter in aquatic ecosystems. In: KUBICEK, C.; DRUZHINIA, I. (Eds.) ***Environmental and microbial relationships: the Mycota***, v. 4, Springer, Berlin, p. 301-324, 2007.

GESSNER, M. O.; VAN RYCKEGEM, G. Water fungi as decomposers in freshwater ecosystems. In: BITTON, G. (Ed) ***Encyclopaedia of environmental microbiology***. Wiley, New York, p. 1-38, 2003.

GESSNER, M.; NEWELL, S. Biomass, growth rate, and production of filamentous fungi in plant litter. In: HURST, C.; CRAWFORD, R.; KNUDSEN,

G.; MCINERNEY, M.; STETZENBACH, L. (Eds.) ***Manual of environmental microbiology***, v. 2, 2^a Ed. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, p. 390-408, 2002.

GESSNER, M. O.; SUBERKROPP, K.; CHAUVET, E. Decomposition of plant litter by fungi in marine and freshwater ecosystems. In: WICKLOW, G. C.; SÖDERSTRÖM, B. (Eds.) ***The mycota***, v. 4. Springer, Berlin, p. 303-322, 1997.

GOLUEKE, C.G. Principles of composting. In: The Sta of BioCycle Journal of Waste Recycling. The Art and Science of Composting. The JG Press Inc., Pennsylvania, USA, p. 14-27. 1991.

- GOLUEKE, C.G., 1992. Bacteriology of composting. *BioCycle* 33, 55±57.
- GORRA, R.; COCI, M.; Ambrosoli, R.; LAANBROEK, H. J. Effects of substratum on the diversity and stability of ammonia-oxidizing communities in a constructed wetland used for wastewater treatment. *Journal Applied of Microbiology*, v. 103, p. 1442-1452, 2007.
- GUPTA R.; GIGRAS P.; MOHAPATRA H.; GOSWAMI V.K.; CHAUHAN B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1599-1616. 2003.
- GUPTA, V.; SMEMO, K. A.; YAVITT, J. B.; FOWLE, D.; BRANFIREUN, B.; BASILIKO, N. Stable isotopes reveal widespread anaerobic methane oxidation across latitude and peatland type. *Environmental Science and Technology*, v. 47, n.15, p. 8273-8279, Jul. 2013.
- HAGLER, A. N.; AHEARN, D. G. Rapid Diazonium Blue B Test to Detect Basidiomycetous Yeasts. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 31, n. 2, p. 204-208, Abr. 1981.
- HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycology Research*, v. 105, p. 1422-1432, 2001.
- HEMPEL, M.; BLUME, M.; BLINDOW, I.; GROSS, E. M. Epiphytic bacterial community composition on two common submerged macrophytes in brackish water and freshwater. *BMC Microbiology*, v. 8, n. 58, Abr. 2008.
- HERRMANN, M.; SAUNDERS, A. M.; SCHRAMM, A. Effect of lake trophic status and rooted macrophytes on community composition and abundance of ammonia-oxidizing prokaryotes in freshwater sediments. *Applied Environmental Microbiology*, v. 75, n. 10, p. 3127-3136, Mai. 2009.
- HERRMANN, M.; SAUNDERS, A. M.; SCHRAMM, A. Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in the rhizosphere of the freshwater macrophyte *Littorella uniflora*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 74, n. 10, p. 3279-3283, Mai. 2008.
- HICKENBICK, G. R.; FERRO, A. L.; ABREU, P. C. Produção de detrito de macrófitas emergentes em uma marisma do estuário da Lagoa dos Patos: taxas de decomposição e dinâmica microbiana. *Atlântica*, Rio Grande, v. 26, p. 61-75, 2004.
- HICKEY, P.; SWIFT, S.; ROCA, M.; READ, N. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Methods in Microbiology*, v. 34, p. 63-87, 2005.
- HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M. Introduction to *Pichia pastoris*. In: HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M. (Eds.) *Pichia* protocols. **Methods in molecular biology**. v. 103. Humana, Totowa, New Jersey, p. 1-15, 1998.

HIORNS, W. D. et al. Amplification of 16S ribosomal-RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of nitrosospiras in the environment. **Microbiology**, v. 141, p. 2793-2800, 1995.

HOLLANTS, J.; LEROUX, O.; LELIAERT, F.; DECLEYRE, H.; DE CLERCK, O.; WILLEMS, A. Who is in there? Exploration of endophytic bacteria within the siphonous green seaweed *Bryopsis* (Bryopsidales, Chlorophyta). **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, Oct. 2011.

HOLLIBAUGH, J. T.; AZAM, F. Microbial degradation of dissolved proteins in sea-water. **Limnology and Oceanography**, v. 28, p. 1104-1116, 1983.

HON, D. N. S. Cellulose: a random walk along its historical path. **Cellulose**, v. 1, n. 1, p. 1-25, Mar. 1994.

HOPPE, H. G. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbeliferly substances. **Marine Ecology Progress Series**, v. 11, p. 299-308, 1983.

HUSS, A.; WEHR, J. D. Strong indirect effects of a submersed aquatic macrophyte, *Vallisneria americana*, on bacterioplankton densities in a mesotrophic lake. **Microbial Ecology**, v. 47, n. 4, p. 305-315, Mai. 2004.

IEFUJI, H. et al. Raw-starch-digesting and thermostable alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. **Biochemistry Journal**, v. 318, p. 989-996, 1996.

INACIO, J.; BEHRENS, S.; FUCHS, B. M.; FONSECA, A.; SPENCER-MARTINS, I.; AMANN, R. In situ accessibility of *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA to Cy3-labeled oligonucleotide probes comprising the D1 and D2 domains. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2899-2905, 2003.

KENNISH, M. J. Coastal salt marsh systems in the US: A review of anthropogenic impacts. **Journal of Coastal Research**, v. 17, n. 3, p. 731-748. 2001.

KIRK, K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white rot fungi. In: Young, R. A.; Akhtar, M. (Eds) **Environmental friendly technologies for pulp and paper industry**. Wiley, New York, p. 273-307, 1998.

KIRK, T. K.; FARREL, R. L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Reviews Microbiology**, v. 41, p. 465-505. 1987.

KLEIN, D. A.; PASCHLE, M. W. Filamentous fungi: the indeterminate lifestyle and microbial ecology. **Microbial Ecology**, v. 47, p. 224-235, 2004.

KÖRNER, S. Nitrifying and denitrifying bacteria in epiphytic communities of submerged macrophytes in a treated sewage channel. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 27, n. 1, p. 27-31, Jan. 1999.

KUEHN, K. A. The role of fungi in the decomposition of emergent wetland plants. In: SRIDHAR, K. R.; BÄRLOCHER, F.; HYDE, K. D. (Eds.) Novel techniques and ideas in mycology, v. 20, ***Fungal Diversity Research Series***, p. 19-41, 2008.

KUEHN, K. A.; LEMKE, M. J.; SUBERKROPP, K.; WETZEL, R. G. Microbial biomass and production associated with decaying leaf litter of the emergent macrophyte *Juncus effusus*. ***Limnological Oceanography***, v. 45, n. 4, p. 862-870, 2000.

KUEHN, K. A.; SUBERKROPP, K. Decomposition of standing litter of freshwater emergent macrophyte *Juncus effusus*. ***Freshwater Biology***, v. 40, p. 717-727, 1998.

LACHANCE, M.; BOWLES, J. M.; STARMER, W. T.; BARKER, J. S. F. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new yeast species from Australian Hibiscus flowers. ***Canadian Journal Microbiology***, v.45, p.172-177, 1999.

LACHANCE, M.; STARMER, W. T.; PHAFF, H. J. Identification of yeasts found in decaying cactus tissue. ***Canadian Journal of Microbiology***, v. 34, p. 1025-1036, Abr., 1988.

LAZÉRA, M. S.; PIRES, F. D. A.; CAMILLO-COURA, L.; NISHIKAWA, M. M.; BEZERRA, C. C. F.; TRILLES, L.; WANKE, B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. ***Medical Mycology***, v. 34, n. 2, p. 127-131, 1996.

LAZÉRA, M. S.; CAVALCANTI, M. A. S.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* - evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. ***Medical Mycology***, v. 36, n. 2, p. 119-122, 1998.

LI, H.F.; CHI, Z.M.; WANG, X.H.; MA, C.L. Amylase production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d. ***Journal of Ocean University of China***, v. 6, p. 61-66, 2007.

LI, S.; Spear, R.; Andrews, J. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Aureobasidium pullulans* on microscope slides and leaf surfaces. ***Applied Environmental Microbiology***, v. 63, p. 3261-3267, 1997.

LIBKIND, D.; BRIZZIO, S.; RUFFINI, A.; GADANHO, M.; VAN BROOCK, M.; SAMPAIO, J. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. ***Antonie van Leeuwenhoek International Journal of Microbiology***, v. 84, p. 313-322, 2003.

LIMTONG, S.; YONGMANITCHAI, W. *Candida chanthaburiensis* sp. nov., *Candida kungkrabaensis* sp. nov. and *Candida suratensis* sp. nov., three novel

yeast species from decaying plant materials submerged in water of mangrove forests. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 3, p 379-388, Out. 2010.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1875-1883, 2003.

LOPERENA, L. et al. Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2249-2256, 2012.

LOUREIRO, S. T. A.; CAVALCANTI, M. A. Q.; NEVES, R. P.; PASSAVANTE, J. Z. O. Yeasts isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 333-337, 2005.

LUNT, H. A. Effects of weathering upon composition of hardwood leaves, *Journal of Forestry*, v. 31, p. 43-45, 1933.

LUSH, D.L.; HYNES, H.B.N. The formation of particles in freshwater leacheates of dead leaves. **Limnology Oceanography**, v. 18, p. 968-977, 1973.

LYONS, J.; NEWELL, S.; BUCHAN, A.; MORAN, M. Diversity of ascomycete laccase gene sequences in a southeastern US salt marsh. **Microbial Ecology**, v. 45, p. 270-281, 2003.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 505-577, 2002.

MADIGAN, M. T. et al. Capítulo 18: Biologia Celular Eucariótica e Microrganismos Eucarióticos. In: ____ . **Microbiologia de Brock**. Tradução Andrea Queiroz Maranhão e colaboradores. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARANGONI, J. C.; COSTA, C. S. B. Caracterização das atividades econômicas tradicionais no entorno das marismas no estuário da Lagoa dos Patos (RS). **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 21, n. 21, p. 129-142, Jan./Jun. 2010.

MARENCO, J. A. Mudanças climáticas globais e seus efeitos sobre a biodiversidade - Caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do Século XXI. Segunda Edição. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 214 p., 2007.

MARSHALL, M.; GULL, K.; JEFFRIES, P. Monoclonal antibodies as probes for fungal wall structure during morphogenesis. **Microbiology**, v. 143, p. 2255-2265, 1997.

MARSHALL, M.; JOINT, I.; CALLOW, M. E.; CALLOW J. A. Effect of marine bacterial isolates on the growth and morphology of axenic plantlets of the green alga *Ulva linza*. **Microbial Ecology**, v. 52, p. 302-310, Ago. 2006.

MATOS, R.M.B.; SILVA, E.M.R. da; BERBARA, R.L.L. **Biodiversidade e Índices**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 1999 20p. (Embrapa CNPAB. Documentos, 107).

MATSUO, Y.; SUZUKI, M.; KASAI, H.; SHIZURI, Y.; HARAYAMA, S. Isolation and phylogenetic characterization of bacteria capable of inducing differentiation in the green alga *Monostroma oxyspermum*. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 25-35, 2003.

MATSUO, Y.; IMAGAWA, H.; NISHIZAWA, M.; SHIZURI, Y. Isolation of an algal morphogenesis inducer from a marine bacterium. **Science**, v. 307, n. 5715 Mar. 2005.

MAUTONE, J. N. et al. Phylloplane yeasts as a source of industrially interesting enzymes. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 2, 2010.

MEDEIROS, A. O.; KOHLERA, L. M.; HAMDANA, J. S.; MISSAGIA, B. S.; BARBOSA, F. A. R.; ROSA, C. A. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. **Water Research**, v. 4, n. 2, p. 3921-3929, 2008.

MIDDELHOVEN, W. J. The yeast flora of some decaying mushrooms on trunks of living trees. **Folia Microbiologica**, v. 49, n. 5, p. 569-573, Set. 2004.

MIDDELHOVEN, W. J. Polysaccharides and phenolic compounds as substrate for yeasts isolated from rotten wood and description of *Cryptococcus fagi* sp. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, p. 57-67, 2006.

MIDDELHOVEN, W. J.; KURTZMAN, C. P. Four novel yeasts from decaying organic matter: *Blastobotrys robertii* sp. nov., *Candida cretensis* sp. nov., *Candida scorzettiae* sp. nov. and *Candida vadensis* sp. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 92, n. 2, p. 233-244, Ago. 2007.

MILLE-LINDBLOM, C.; FISCHER, H.; TRANVIK, L. J. Antagonism between bacteria and fungi: substrate competition and a possible tradeoff between fungal growth and tolerance towards bacteria. **Oikos**, v. 113, p. 233-242, 2006 a.

MILLE-LINDBLOM, C.; FISCHER, H.; TRANVIK, L. J. Litter-associated bacteria and fungi: a comparison of biomass and communities across lakes and plant species. **Freshwater Biology**, v. 51, p. 730-74, 2006 b.

MILLE-LINDBLOM, C.; VON WACHENFELDT, E.; TRANVIK, L. J. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples

after fungal death. **Journal of Microbiological Methods**, v. 59, p. 253-262, 2004.

MITCHELL, J. I.; ZUCCAROA. Sequences, the environment and fungi. **Mycologist**, v. 20, p. 62-74, 2006.

MØLLER, J., MILLER, M., KJØLLER, A. Fungal-bacterial interaction on beech leaves: influence on decomposition and dissolved organic carbon quality. **Soil, Biology, and Biochemistry**, v. 31, p. 367-374, 1999.

MÖLLER, O.; FERNANDES, E. Hidrologia e Hidrodinâmica. In: SEELIGER, U; ODEBRECHT, C. (Eds.). **O Estuário da Lagoa dos Patos: Um Século de Transformações**. Rio Grande: FURG, 2010, p. 17-30.

MONTEMAYOR, D. I.; ADDINO, M.; FANJUL, E.; ESCAPA, M.; ALVAREZ, M. F.; BOTTO, F.; IRIBARNE, O. O. Effect of dominant *Spartina* species on salt marsh detritus production in SW Atlantic estuaries. **Journal of Sea Research**, Texel, v. 66, n. 2, p. 104–110. Ago. 2011.

MOORE , J. C.; BERLOW, E. L.; COLEMAN, D. C. Detritus, trophic dynamics and biodiversity. **Ecology Letters**, v. 7, p. 584-600, 2004.

MUDGE, S.M.; NORRIS, C. E. Lipid biomarkers in the Conwy Estuary (North Wales, U.K.): a comparison between fatty alcohols and sterols. **Marine Chemistry**, v.57, p. 61-84, 1997.

MUSSA, A. Y.; RANDHAWA, H. S.; KHAN, Z. U. Decaying wood as a natural habitat of melanin-forming (Mel+) variant of *Cryptococcus laurentii*. **Current Science**, v. 79, n. 10, Nov. 2000.

MYERS, S. P. et al. *Pichia spartinae*, a dominant yeast of the *Spartina* salt marsh. **Industrial Microbiology**, v. 16, p. 261-267, 1975

NAKANISHI, K.; NISHIJIMA, M.; NISHIMURA, M.; KUWANO, K.; SAGA, N. Bacteria that induce morphogenesis in *Ulva pertusa* (Chlorophyta) grown under axenic conditions. **Journal of Phycology**, v. 32, p. 479-482, 1996.

NAKANISHI, K.; NISHIJIMA, M.; NOMOTO, A. M.; YAMAZAKI, A.; SAGA, N. Requisite morphologic interaction for attachment between *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and symbiotic bacteria. **Marine Biotechnology**, v. 1, p. 107-111, 1999.

NEUBERT, K.; Mendgen, K.; Brinkmann, H.; Wirsal, S. Only a few fungal species dominate highly diverse mycofloras associated with the common reed. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, p. 1118-1128, 2006.

NIELSEN, K. B.; KJØLLER, R.; OLSSON, P. A.; SCHWEIGER, P. F.; ANDERSEN, F. O.; ROSENDAHL, S. Colonisation and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the aquatic plants *Littorella uniflora* e *Lobelia dortmanna* in southern Sweden. **Mycology Research**, v. 108, p. 616-625, 2004.

NEWELL, S. Y. Decomposition of shoots of a salt-marsh grass: methodology and dynamics of microbial assemblages. ***Advances in Microbial Ecology***, v. 13, p. 301-326, 1993.

NEWELL, S. Y. Minimizing ergosterol loss during preanalytical handling and shipping of samples of plant litter. ***Applied Environmental Microbiology***, v. 61, p. 2794-2797, 1995.

NEWELL, S. Y.; FALLON, D. R.; MILLER, J. D. Decomposition and microbial dynamics for standing, naturally positioned leaves of salt marsh grass *Spartina alterniflora*. ***Marine Biology***, v. 101, p. 471-481, 1989.

NEWELL, S. Y.; PALM, L. A. Responses of bacterial assemblages on standing-decaying blades of smooth cordgrass to additions of water and nitrogen. ***International Review of Hydrobiology***, v. 83, p. 115-122, 1998.

NEWELL, S. Y.; PORTER, D. Microbial secondary production from saltmarsh grass shoots and its known potential fates. p. 159-185. In: WIENSTEN, M. P.; KREEGER, D. A. (Eds.) Concepts and controversies in tidal marsh ecology. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 2000.

NIKOLAUSZ, M. et al. Diurnal redox fluctuation and microbial activity in the rhizosphere of wetland plants. ***European Journal of Soil Biology***, v. 44, n. 3, p. 324-333, Jun. 2008.

NIKOLCHEVA, L.; COCKSHUTT, A.; BÄRLOCHER, F. Determining diversity of freshwater fungi on decaying leaves: comparison of traditional and molecular approaches. ***Applied Environmental Microbiology***, v. 69, p. 2548-2554, 2003.

NIKOLCHEVA, L.; BÄRLOCHER, F. Taxon-specific fungal primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream. ***Mycological Progress***, v. 3, p. 41-49, 2004.

NIKOLCHEVA, L. G.; BÄRLOCHER, F. Seasonal and substrate preferences of fungi colonizing leaves in streams: traditional versus molecular evidence. ***Environmental Microbiology***, v. 7, p. 270-280, 2005.

NITIYON, S.; BOONMAK, C.; AM-IN, S.; JINDAMORAKOT, S., KAWASAKI, H.; YONGMANITICHAI, W.; LIMTONG, S. *Candida saraburiensis* sp. nov. and *Candida prachuapensis* sp. nov., xylose-utilizing yeast species isolated in Thailand. ***International Journal Systematic and Environmental Microbiology***, v. 61, n. 2, p. 462-468, Fev. 2011.

ODUM, W. E. Comparative ecology of tidal freshwater and salt marshes. ***Annual Review of Ecology and Systematics***, v. 19, p. 147-176, 1988.

OLIVEIRA, T. M. dos S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. Dissertação de mestrado, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010.

PASCOAL, C.; CÁSSIO, F. Linking fungal diversity to the functioning of freshwater ecosystems. In: SRIDHAR, K. R.; BÄRLOCHER, F.; HYDE, K. D. (Eds) Novel techniques and ideas in mycology, v. 20, **Fungal Diversity Research Series**, p 1-19, 2008.

PEDERSEN, O.; SAND-JENSEN, K.; REVSBECH, N. P. 1995. Diel pulses of O₂ and CO₂ in sandy sediments inhabited by *Lobelia dortmanna*. **Ecology**, v. 76, p. 1536-1545, 1995.

PERAZOLLO, J.; PINHEIRO, F. Aspectos anatômicos e adaptativos das partes vegetativas de *Spartina densiflora* Brong (Graminea) da marisma do estuário da Lagoa dos Patos – RS. **Acta Botanica Brasílica**, Feira de Santana, v. 5, p. 3-16, 1991.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, p. 53-63, Abr. 2002.

PEREZ-OSORIO, A. C.; FRANKLIN, M. J. qRT-PCR of microbial biofilms. **Cold Spring Harbor Protocols**, 2008. DOI:10.1101/pdb.prot5066

PIELOU, E.C. Population and community ecology.-principles and methods. CRC Press, Science. Jan. 1974. 424 p.

PIMENTAI, R.S. et al. Yeast communities in two Atlantic rain Forest fragments in Southeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 1, Jan./Mar. 2009.

PROVASOLI, L.; PINTNER, I. J. Bacteria induced polymorphism in axenic laboratory strain of *Ulva lactuca* (Chlorophyceae). **Journal of Phycology**, v. 16, p. 196-201, 1980.

PUGH, G.; MULDER, J. Mycoflora associated with *Typha latifolia*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, p. 273-282, 1971.

QUEIROZ, L. E. Análise quanti – qualitativa de leveduras isoladas de algas marinhas. I - Recife, Instituto de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, publ. 677, 1972.

VAN DER LELIE, D. et al. The Metagenome of an Anaerobic Microbial Community Decomposing Poplar Wood Chips. **PLoS One**, v. 7, n. 5, Mai. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0036740

RACHINI, A. et al. An anti-beta-glucan monoclonal antibody inhibits growth and capsule formation of *Cryptococcus neoformans* in vitro and exerts therapeutic,

anticryptococcal activity in vivo. *Infection and Immunity*, v. 75, p. 5085-5094, 2007.

RAJA, H. A.; FERRER, A.; SHEARER, C.A.; MILLER A. N. Freshwater ascomycetes: *Wicklowia aquatica*, a new genus and species in the Pleosporales from Florida and Costa Rica. *Mycoscience*, v. 51, n. 3, p. 208-214, Mai. 2010.

RANWELL, D. S. **Ecology of salt marshes and sand dunes**. Chapman and Hall, London. 258 p. 1972.

RANDHAWA, H.S.; MUSSA, A. Y.; KHAN, Z. U. Decaying wood in tree trunk hollows as a natural substrate for *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi of clinical interest, *Mycopathologia*, v. 151, n. 2, p. 63-69, Ago. 2001.

RASCONI, S.; Jobard, M.; Jouve, L.; Sime-Ngando, T. Use of Calcofluor White for detection, identification, and quantification of phytoplanktonic fungal parasites. *Applied Environmental Microbiology*, v. 75, p. 2545-2553, 2009.

RAVIRAJA, N.; NIKOLCHEVA, L.; BÄRLOCHER, F. Diversity of conidia of aquatic hyphomycetes assessed by microscopy and by DGGE. *Microbial Ecology*, v. 49, p. 301-307, 2005.

REDECKER, D. Molecular ecology of arbuscular mycorrhizal fungi: a review of PCR-based techniques. In: COOPER, J., RAO, J.R. (Eds.) **Molecular techniques for soil and rhizosphere microorganisms**. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK, p. 198-212, 2006.

ROBIN, J.; ARFFA, R.; AVNI, I.; RAO, N. Rapid visualization of three common fungi using fluorescein-conjugated lectins. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 27, p. 500-506, 1986.

RÖDER, C.; KÖNIG, H.; FRÖHLICH, J. Species-specific identification of *Dekkera brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. *FEMS Yeast Research*, v. 7, p. 1013-1026, 2007.

ROMANÍ, A. M.; FISCHER, H.; MILLE-LINDBLÖM, C.; TRANVIK, L. J. Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: differential extracellular enzyme activities. *Ecology*, v. 87, n. 10, p. 2559-2569, Out. 2006.

ROMANOS, M. A.; SCORER, C. A.; CLARE, J. J. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, v. 8, p. 423-488, 1992.

ROSENFELD, S. A. Use of *Pichia pastoris* for expression of recombinant proteins. *Methods Enzymology*, v. 306, p.154-169, 1999.

RUSSO, G.; LIBKIND, D., ULLOA, R. J.; GARCÍA, V.; SAMPAIO, J. P.; VAN BROOCK, M. R. *Cryptococcus agrionensis* sp. nov., a basidiomycetous yeast of the acidic rock drainage ecoclade, isolated from an acidic aquatic environment

of volcanic origin. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, v. 60, n. 4, p. 996-1000, Abr. 2010.

RYBAKOVA, I. V. Number, biomass, and activity of bacteria in the water of overgrowths and periphyton on higher aquatic plants. *Inland Water Biology*, v. 3, n. 4, p. 307-312, 2010.

SAMPAIO, A.; SAMPAIO, J. P.; LEÃO, C. Dynamics of yeast populations recovered from decaying leaves in a nonpolluted stream: a 2-year study on the effects of leaf litter type and decomposition time. ***FEMS Yeast Research***, v. 7, p. 595-603, 2007.

SANDBERG, D. C.; BATTISTA, L. J.; ARNOLD, E. Fungal endophytes of aquatic macrophytes: diverse host-generalists characterized by tissue preferences and geographic structure. ***Microbial Ecology***, Jan. 2014. DOI: 10.1007/s00248-013-0324-y.

SCHADT, C. W.; MARTIN, A. P.; LIPSON, D. A.; SCHMIDT, S. K. Seasonal dynamics of previously unknown fungal lineages in tundra soils. ***Science***, v. 301, p. 1359-1361, 2003.

SCHÜBLER, A.; BONFANTE, P.; SCHNEPF, E.; MOLLENHAUER, D.; KLUGE, M. Characterization of the Geosiphon pyriforme symbiosome by affinity techniques: confocal laser scanning microscopy (CLSM) and electron microscopy. ***Protoplasma***, v. 190, p. 53-67, 1996.

SCIESSERE, L. I.; CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI JR., I. Cellulase and xylanase activity during the decomposition of three aquatic macrophytes in a tropical oxbow lagoon. ***Brazilian Journal of Microbiology***, v. 42, n.3, São Paulo July/Sept. 2011. SEELIGER, 2004

SCIESSERE, L. Demanda de oxigênio da mineralização de detritos refratários de macrófitas aquáticas. Dissertação (Mestrado). São Carlos: UFSCar, 2007. 84 f.

SCHULZ, M. J.; THORMANN, M. N. Functional and taxonomic diversity of saprobic filamentous fungi from *Typha latifolia* from Central Alberta, Canada. ***Wetlands***, v. 25, n. 3, p. 675–684, Set. 2005.

SCHULTZ, D. M.; QUINN, J. G. Fatty acid composition of organic detritus from *Spartina alterniflora*. ***Estuarine and Coastal Marine Science***, v. 1, n. 2, p. 177-190, 1973.

SEENA, S.; WYNBERG, N.; BÄRLOCHER, F. Fungal diversity during leaf decomposition in a stream assessed through clone libraries. ***Fungal Diversity***, v. 30, p.1-14, 2008.

SHIBA, T.; Taga, N. Heterotrophic bacteria attached to seaweeds. ***Journal of Experimental Marine Biology and Ecology***, v. 47, p. 251–258, 1980.

SILVEIRA, E. S. da. DIVERSIDADE DE FUNGOS E LEVEDURAS NA REGIÃO ESTUARINA DA LAGOA DOS PATOS E PRAIA DO CASSINO, RS – BRASIL. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS. 128 p. Ago. 2012.

SIMÕES, M. P.; CALADO, M. L.; MADEIRA, M.; GAZARINIA, L. C. Decomposition and nutrient release in halophytes of a Mediterranean salt marsh. ***Aquatic Botany***, Amsterdã, v. 94, n. 3, p. 119–126. Abr. 2011.

SINSABAUGH, R. L.; HILL, B. H.; SHAH, J.J. F. Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. ***Nature*** v. 462, p. 795-798, Dez. 2009. DOI: 10.1038/nature08632

SHEPARD, C. C.; CRAIN, C. M.; BECK, M. W. The protective role of coastal marshes: a systematic review and meta-analysis. ***PLoS ONE***, v. 6, Nov. 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0027374

SLIFKIN, M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. ***Journal of Clinical Microbiology***, v. 38, p. 4626–4628, 2000.

SMITH HL, JR, GOODNER K. Detection of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods. ***Journal of Bacteriology***, v. 76, p. 662–665, 1958.

SØNDERGAARD, M.; LAEGAARD, S. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in some aquatic vascular plants. ***Nature***, v. 268, p. 232-233, 1977.

SPEAR, R.; LI, S.; NORDHEIM, E.; ANDREWS J. Quantitative imaging and statistical analysis of fluorescence in situ hybridization (FISH) of *Aureobasidium pullulans*. ***Journal of Microbiology Methods***, v. 35, p.101-110, 1999.

SNAJDR, J. et al. Transformation of *Quercus petrae* litter: successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial community composition. ***FEMS Microbiology Ecology***, v. 75, p. 291-303, 2011.

SQUIERS, E. R.; GOOD, R. E. Seasonal changes in the productivity, caloric content, and chemical composition of a population of salt-marsh cord-grass (*Spartina alterniflora*). ***Chesapeake science***, v. 15, n. 2, p. 63-71, 1974.

STACH, J. E.; MALDONADO, L. A.; MASSON, D. G.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M.; BULL, A. T. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. ***Applied Environmental Microbiology***, v. 69, p. 6189-6200, 2003.

STARMER, W. T. Analysis of the community structure of yeasts associated with the decaying stems of cactus. I. *Stenocereus gummosus*. ***Microbial Ecology***, v. 8, n. 1, p. 71-81, Jun. 1982.

STARMER, W. T.; PHAFF, H.J.; MIRANDA, M.; MILLER, M. W.; HEED, W. B. The yeast flora associated with the decaying stems of columnar cacti and *Drosophila* in North America. ***Evolutionary Biology***, v. 14, p. 269-295, Jan. 1982.

STECH, J. L.; LORENZETTI, J. A. The response of the south Brazil Bight to the passage of wintertime cold fronts. ***Journal of Geophysiology Research***, v. 97, n. 6, p. 9507-9520, 1992.

STERFLINGER, K. Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. In: ROSA, C. A.; PETER, G. (Eds.) ***Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts***, p. 505–518. Springer Verlag, Berlin.

STOECKER, D. K.; CAPUZZO, J. M. Predation on protozoa: its importance of zooplankton. ***Journal of Plankton Research***, Londres, v. 12, p. 891-908, 1990.

SUBERKROPP, K. Fungal biomass and growth. In: Sridhar, K. R.; Bärlocher, F.; Hyde, K. (Eds.) Novel ideas and techniques in mycology. ***Fungal Diversity Research Series***, v. 20, p. 203-213, 2008.

SWIFT, M. J.; HEAL, D. W.; ANDERSON, J. M. ***Studies in ecology. Decomposition in terrestrial ecosystems***. Blackwell, Oxford. 371 p. 1979.

TAYLOR, D. L.; HOLLINGSWORTH, T. N.; MCFARLAND, J.; LENNON, N. J.; NUSBAUM, C.; RUESS, R. W. A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. ***Ecology***, 2013. DOI:10.1890/12-1693.1

TEDESCO, M. J. et al. ***Análises de solo, plantas e outros materiais***. Boletim técnico de Solos, Departamento de Solos/UFRGS. 2ª Ed. Porto Alegre, n. 5, 174 p. 1995.

THOMAZ, S. M.; BINI, L. M.; PAGIORO, T. A. Amostragem em Limnologia, p. 193-212. In: BICUDO, C. E. M.; BICUDO, D. C. (Orgs.) ***Métodos em Limnologia: macrófitas aquáticas***. RiMa, São Carlos. 351 p., 2004.

THOUMELIN, G.; BODINEAU, L.; WARTEL, M. Origin and transport of organic matter across the Seine estuary: Fatty acid and sterol variations., v. 58, n. 1-2, p. 59-71, Out. 1997.

TOMAZELLI, L. J. Regime dos ventos e a taxa de migração das dunas eólicas costeiras do Rio Grande do Sul, Brasil. ***Pesquisas***, Porto Alegre, v. 20, n. 1, p. 18-26, 1993.

TORZILLI, A. P. Polysaccharidase production and cell wall degradation by several salt marsh fungi. ***Mycologia***, v. 74, n. 2, p. 297-302, Mar./Abr., 1982.

TORZILLI, A. P.; ANDRYKOVITCH, G. Degradation of *Spartina* lignocellulose by individual and mixed cultures of salt-marsh fungi. **Canadian Journal of Botany**, v. 64, n.10, p. 2211-2215, 1986.

TORZILLI, A. P.; SIKAROODI, M.; CHALKLEY, D.; GILLEVET, P. M. A comparison of fungal communities from four salt marsh plants using automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA). **Mycologia**, v.98, p. 690-698, 2006.

TRIAS et al. Emergent macrophytes act selectively on ammonia-oxidizing Bacteria and Archaea. **Applied Environmental Microbiology**, v. 78, n. 17, p; 6352-6356, Set. 2012.

TSUCHIYA, Y.; HIRAKI, A.; KIRIYAMA, C.; ARAKAWA, T.; KUSAKABE, R.; MORISAKI, H. Seasonal change of bacterial community structure in a biofilm formed on the surface of the aquatic macrophyte *Phragmites australis*. **Microbes and Environments**, v. 26, n. 2, 113-119, 2011.

TURCHETTI, B. et al. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 63, n. 1, p. 73-83, 2008.

TURNER, J. B.; FRIEDMANN, E. I. Fine structure of capitular filaments in the coenocytic green alga *Penicillus*. **Journal of Phycology**, v. 10, p. 125-134, 1974.

VAN DER WALT, J. P.; HOPSON-HAM, V. K. A colour reaction for the differentiation of ascomycetous and hemibasidiomycetous yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 42, p. 157-163, 1976.

VANDENKOORNHUYSE, P.; BALDAUF, S. L.; LEYVALSTRACZEK, C. J.; YOUNG, J. P. Extensive fungal diversity in plant roots. **Science**, v. 295, p. 2051, 2002.

VAN RYCKEGEM, G.; GESSNER, M.; VERBEKEN, A. Fungi on leaf blades of *Phragmites australis* in a brackish tidal marsh: diversity, succession, and leaf decomposition. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 600-61, 2007.

VÖRÖSMARTY et al. Analyzing the discharge regime of a large tropical river trough remote sensing, ground-based climatic data, and modeling. **Water Resource Research**, v. 32, p. 3137-3150, 1996.

WANG, L.; CHI, Z.M.; WANG, X.H.; LIU, Z.Q.; LI, J. Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes. **Annals of Microbiology**, v. 57, 495-501, 2007.

WEBSTER, J. R.; BENFIELD, E. F. Vascular plant breakdown in freshwater ecosystems. **Annual Reviews Ecology Systematics**, v. 17, p. 567-594, 1986.

WETZEL, R. G.; LIKENS, G. E. **Lymnological Analyses**. Springer-Verlag, New York. 391 p. 1991.

WETZEL, P. R.; VAN DER VALK, A. G. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in prairie pothole wetland vegetation in Iowa and North Dakota. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, p. 883-890, 1996.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. P. 315-322 In: **PCR Protocols: a guide to methods and applications**, Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. (Eds). Academic Press, Inc., New York, 1990.

WHITE, J. A.; CHARVAT, I. The mycorrhizal status of an emergent aquatic, *Lythrum salicaria* L., at different concentrations of phosphorus availability. **Mycorrhiza**, v. 9, p. 191-197, 1999.

WIDER, K. R.; LANG, G. A critique of the analytical methods used in examining decomposition data obtained from litter bags. **Ecology**, v. 63, n. 6, p. 1636-1642, Dez. 1982.

WIGAND, C.; ANDERSEN, F. Ø.; CHRISTENSEN, K. K.; HOLMER, M.; JENSEN, H. S. Endomycorrhizae of isoetids along a biogeochemical gradient. **Limnological Oceanography**, v. 43, p. 508-515, 1998.

WIGAND, C.; STEVENSON, J.C. The presence and possible ecological significance of mycorrhizae of the submersed macrophyte, *Vallisneria americana*. **Estuaries**, v. 17, p. 206-215, 1994.

WILLOT, S. J. Species accumulation curves and the measure of sampling effort. **Journal of Applied Ecology**, v. 38, p. 484-486, 2001.

WING, S. R.; MCLEOD, R. J.; LEICHTER, J. J.; FREW, R. D.; LAMARE, M. D. Sea ice microbial production supports Ross Sea benthic communities: influence of a small but stable subsidy. **Ecology**, v. 93, n. 2, Fev. 2012.

WOHL, D. L.; MCARTHUR, J. V. Actinomycete-flora associated with submersed freshwater macrophytes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 135-140, Mar. 1998.

WOHL, D. L.; MCARTHUR, J. V. Aquatic actinomycete-fungal interactions and their effects on organic matter decomposition: a microcosm study. **Microbial Ecology**, v. 42, n. 3, p. 446-457, Out. 2001.

WURZBACHER, C. M.; BÄRLOCHER, F.; GROSSART, H. Fungi in lake ecosystems. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 59, p. 125-149, Mar. 2010.

ZHANG, C.; KIM, S. Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1920-1934, 2010.

ZHOU, J., XIA, B.; TREVES, D. S.; WU, L. Y.; MARSH, T. L.; O'NEILL, R. V.; PALUMBO, A. V.; TIEDJE, J. M. Spatial and resource factors influencing high

microbial diversity in soil. ***Applied Environmental Microbiology***, v. 68, p. 326-334, 2002.

ZUCCARO, A.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J. W.; KOHLMAYER, J.; DRAEGER, S.; MITCHELL, J. I. Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus*. ***Applied Environmental Microbiology***, v. 74, n.4, p. 931-941, Fev. 2008.