

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG  
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA

FUNGOS E LEVEDURAS NA ÁGUA E PLANTAS  
MACRÓFITAS EM DECOMPOSIÇÃO DA REGIÃO  
ESTUARINA DA LAGOA DOS PATOS E PRAIA DO  
CASSINO, RS - BRASIL

**ERICA DA SILVA SILVEIRA**

Tese apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica  
da Universidade Federal do Rio Grande,  
como requisito parcial à obtenção do título de  
DOUTOR.

Orientador: Paulo Cesar Abreu

RIO GRANDE, AGOSTO 2012

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paulo Abreu pela orientação, confiança, seriedade, ajuda e condições para que este trabalho fosse conduzido.

Aos professores Drs. Cesar Costa, Clarisse Odebrecht e Eliana Furlong, membros da banca de acompanhamento, que sempre se mostraram disponíveis durante a condução deste trabalho.

À prof. Dra. Virginia Tavano, pela atenção dedicada no convívio durante estes 4 anos.

Ao Programa de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração (PELD), financiado pelo CNPQ, no âmbito do qual grande parte deste trabalho foi desenvolvido.

À Vera que sempre me socorreu nas dúvidas sobre o regimento, disciplinas, créditos, regras e concedeu dicas valiosas.

Ao Programa de Pós Graduação em Oceanografia Biológica, aos professores das disciplinas cursadas e todos aqueles que me apoiaram na condução das etapas deste trabalho.

Ao Cnpq pelo suporte financeiro.

À minha família que na sua simplicidade sempre valorizou este trabalho e me apoiou de muitas formas o tempo todo.

À família Coch que me adotou como membro e foi meu porto seguro nesta cidade.

Aos meus colegas Laboratório de Fitoplâncton e de Microrganismos Marinhos. Passamos muito tempo juntos, dividindo trabalho e vida, o que transformou dias difíceis, na maioria das vezes, em histórias engraçadas. E a “salinha” me fez forte nos últimos dias deste trabalho. Sozinha teria sido bem difícil, mas com vocês queridos amigos Hay Theig, Carol, Márcio, Alessandra, Amália e

Priscila foi bem mais fácil. E desejo pra vocês ao longo da vida, que encontrem pessoas exatamente como vocês, que são totalmente feitos de coração.

À Lucélia, pela ajuda indispensável, desde o início até o fim deste trabalho. Valeu The Best!

Às queridas amigas Fernanda e Lise Maria, que foram amigas, colegas, vizinhas e fizeram deste período um agradável tempo a ser lembrado.

Aos meus amigos da vida toda, por terem me apoiado nos momentos complicados, me alegrado sempre, apesar das minhas ausências.

Ao Msc Rubens Lobato, pela ajuda em muitas etapas deste trabalho.

A todos que colaboraram de alguma forma para que este trabalho fosse concluído, muito obrigada!

## ÍNDICE

Resumo.....	6
Abstract.....	8
Introdução geral.....	10
Objetivos e hipóteses de trabalho.....	18
Objetivo geral.....	18
Objetivos específicos.....	18
Hipóteses.....	18
Referências.....	19

### Capítulo I

Fungos no estuário da Lagoa dos Patos e Praia do Cassino, Rio Grande, RS - Brasil.	26
Resumo.....	26
Introdução.....	27
Materials e métodos.....	30
Local de estudo.....	30
Isolamento de Fungos e Leveduras.....	31
Análise estatística.....	32
Resultados.....	33
Discussão.....	41
Referências.....	47

### Capítulo II

Varição Espacial de Fungos e Leveduras no Estuário da Lagoa dos Patos e Praia do Cassino, Rio Grande, RS, Brasil	54
Resumo.....	54
Introdução.....	55
Material e métodos .....	58
Isolamento e identificação de fungos e leveduras das amostras.....	60
Análise estatística.....	61

Resultados.....	62
Discussão.....	72
Referências.....	80

### Capítulo III

Colonização de fungos durante a decomposição de três espécies de macrófitas emergentes em um marisma do estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande, RS..	88
Resumo.....	88
Introdução.....	89
Material e métodos.....	93
Local de estudo.....	93
Isolamento e identificação de fungos .....	95
Análise da decomposição.....	96
Carbono e Nitrogênio orgânico particulado.....	97
Resultados .....	97
Isolados identificados/planta.....	97
Decomposição.....	99
Carbono e nitrogênio.....	103
Discussão .....	105
Colonização e sucessão fúngica.....	105
Referências.....	111
<b>Discussão Geral</b> .....	124
Variação espacial e temporal de fungos no estuário da Lagoa dos Patos.....	124
Interação entre os fungos do marisma e da coluna de água do estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente.....	127
Sucessão de gêneros de fungo durante a decomposição de macrófitas aquáticas no estuário da Lagoa dos Patos.....	129
Perspectivas futuras.....	130
Referências.....	131

## RESUMO

A região estuarina da Lagoa dos Patos é um ecossistema onde predomina a cadeia alimentar detritívora e onde as macrófitas são os principais produtores primários, disponibilizando, na forma de detrito, matéria e energia para os organismos aquáticos consumidores. No processo de formação de detrito, os fungos têm grande participação. Entretanto, é escasso o conhecimento sobre a diversidade dos fungos nas regiões de marisma e na coluna de água deste ecossistema estuarino. Com o objetivo de determinar a diversidade de fungos e leveduras neste estuário e região costeira adjacente, foram analisadas amostras mensais de água em três estações distribuídas entre o estuário da Lagoa dos Patos e a praia do Cassino, nos períodos de março de 2007 à junho de 2008 (período 1) e junho de 2009 à junho de 2010 (período 2). As relações entre as variáveis abióticas, como temperatura da água, salinidade, pH, transparência (disco de Secchi), material particulado em suspensão (MPS) e os nutrientes inorgânicos dissolvidos (fosfato, amônia, nitrito e nitrato), também foram consideradas. Além disso, foi pesquisada a colonização de fungos durante a decomposição das macrófitas *Spartina alterniflora*, *S. densiflora* e *Scirpus maritimus*, através da metodologia de “litter-bags”, que foram depositados em uma marisma no estuário da Lagoa dos Patos, e retirados para análises nos períodos de 7, 15, 30, 90 e 180 dias. As concentrações de carbono e nitrogênio do detrito nos “litter-bags” também foram avaliadas. Os dois períodos de coleta de água apresentaram diferenças na diversidade fúngica, sendo que no período de março de 2007 à junho de 2008 a distribuição destes foi afetada, principalmente, pela salinidade e concentrações de amônia e fosfato e em junho de 2009 à junho de 2010, pela

quantidade de MPS, temperatura da água, salinidade, concentrações de nitrito+nitrato e fosfato e pH. Nos dois períodos (1 e 2) foram isolados os gêneros: *Alternaria* , (1), *Aspergillus* ,(1,2), *Aureobasidium*,(1), *Bispora* ,(1,2) *Botryoderma* , (1,2), *Botryotrichum* ,(1), *Cladosporium* ,(1,2), *Chrysosporium* ,(1), *Dictyosporium* ,(2), *Helminthosporium* ,(1), *Monosporium* ,(1), *Papilospora* ,(1), *Paecilomyces* ,(2), *Penicillium* ,(1,2), *Phialophora* , (2), *Rhizoctonia* ,(2), *Scopulariopsis* ,(2), *Speiropsis* ,(2), *Syncephalastrum* ,(2), *Tilletiopsis* ,(2), *Trichoderma* ,(1,2), *Trichophyton* ,(1,2), *Verticillium* ,(2), além das leveduras *Candida parapsilosis* (2), *Cryptococcus albidus*(2), *Issatchenkia orientalis*(2), *Rhodotorula mucilaginosa* (2), *Rhodotorula minuta* (2) e *Yarrowia lipolytica* (2), leveduras não identificadas (1,2), e fungos não esporulados (1). A microalga *Prototheca* (2), que tem características de fungo, também foi identificada neste estudo. A colonização fúngica em *S. alterniflora* (Sa), *S. densiflora* (Sd) e *S. maritimus* (Sm) foi distinta na composição dos gêneros quanto com relação ao período de aparecimento durante o experimento, tendo sido isolados os gêneros *Acremonium* ,(Sm), *Amblyosporium* ,(Sd), *Botryoderma* ,(Sa,Sd), *Bispora* ,(Sm), *Cercospora* ,(Sa,Sm), *Fusarium* ,(Sa,Sd), *Gonatobotriys* ,(Sm), *Microsporium* ,(Sa), *Mucor* ,(Sa,Sm), *Penicillium* ,(Sa,Sm), *Rhizopus* ,(Sm), *Rhizoctonia* ,(Sa,Sm), *Rhynchosporium* ,(Sm), *Scedosporium* ,(Sd), *Thallospora* ,(Sd), *Tilletiopsis* ,(Sm) e *Trichophyton* , (Sd). A decomposição de *S. densiflora* e *S. maritimus* se processou de modo semelhante, restando cerca de 64% do material inicial da planta após 180 dias do experimento, enquanto que *S. alterniflora* apresentava apenas 35% da biomassa seca inicial neste mesmo período. *S. maritimus* foi a espécie que apresentou maior diversidade fúngica na decomposição e isto pode estar relacionado à maior quantidade de

nitrogênio presente na biomassa desta planta. Além disto, o aumento constante de nitrogênio no detrito de *S. maritimus* pode ter resultado da incorporação deste nutriente pelos fungos que colonizaram o detrito ao longo do estudo.

#### ABSTRACT

The estuarine region of Patos Lagoon is an ecosystem dominated by the detritus food chain and where macrophytes are the main primary producers, furnishing matter and energy to aquatic consumers. In the process of detritus formation, fungi play an important role. However, there is little knowledge about the diversity of fungi in the salt marsh and in the water column of this estuarine ecosystem. In order to determine the diversity of fungi and yeasts in the estuary and adjacent coastal area, water samples were monthly collected and analyzed in three stations distributed along the Patos Lagoon estuary and Cassino Beach, from march 2007 to june 2008 (period 1) and from june 2009 to june 2010 (period 2). The relationship between the abiotic variables such as water temperature, salinity, pH, transparency (Secchi disk), suspended particulate matter (SPM) and dissolved inorganic nutrients (phosphate, ammonia, nitrite and nitrate) and fungi was also considered. In addition, we also studied the colonization of fungi during decomposition of macrophytes *Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora* and *Scirpus maritimus* using litter bags, which were deposited in a salt marsh in the Patos Lagoon estuary, and collected for analysis on days 7, 15, 30, 90, 180. Concentrations of carbon and nitrogen of the material in the litter bags were also analyzed. The two sampling periods of water showed differences in fungal diversity, and from march 2007 to june 2008 the distribution of these organisms was mainly affected by salinity and concentrations of ammonia and phosphate, whereas from june 2009 to june

2010 was mainly by water temperature, salinity, concentrations of nitrite, nitrate and phosphate and pH. The following genera were isolated in these two periods (1 and 2) *Alternaria* , (1), *Aspergillus* ,(1,2), *Aureobasidium* ,(1), *Bispora* ,(1,2), *Botryoderma*,(1,2), *Botryotrichum* ,(1), *Cladosporium* ,(1,2), *Chrysosporum* ,(1), *Dictyosporium* ,(2), *Helminthosporium* ,(1), *Monosporium* ,(1), *Papilospora* ,(1), *Paecilomyces* ,(2), *Penicillium* ,(1,2), *Phialophora* , (2), *Rhizoctonia* ,(2), *Scopulariopsis* ,(2), *Speiropsis* ,(2), *Syncephalastrum* ,(2), *Tilletiopsis* ,(2), *Trichoderma* ,(1,2), *Trichophyton* ,(1,2), *Verticillium* ,(2), in addition of the yeast *Candida parapsilosis* (2), *Cryptococcus albidus* (2), *Issatchenkia orientalis* (2), *Rhodotorula mucilaginosa* (2), *Rhodotorula minuta* (2) e *Yarrowia lipolytica* (2), unidentified yeast (1,2), and non-sporulated fungi (1). The microalgae *Prototheca* (2), which has characteristics of fungus, was also identified in this study. The fungal colonization in *S.alterniflora* (Sa), *S.densiflora* (Sd) and *S.maritimus* (Sm) differed in both genus composition and time of appearance during the experiment, has been the following genera: *Acremonium* ,(Sm), *Amblyosporium* ,(Sd), *Botryoderma* ,(Sa,Sd), *Bispora* ,(Sm), *Cercospora* ,(Sa,Sm), *Fusarium* ,(Sa,Sd), *Gonatobotriys* ,(Sm), *Microsporium* ,(Sa), *Mucor* ,(Sa,Sm), *Penicillium* ,(Sa,Sm), *Rhizopus* ,(Sm), *Rhizoctonia* ,(Sa,Sm), *Rhynchosporium* ,(Sm), *Scedosporium* ,(Sd), *Thallospora* ,(Sd), *Tilletiopsis* ,(Sm) e *Trichophyton* ,(Sd). Moreover, several genus showed specificity for the plant species. The decomposition of *S. densiflora* and *S. maritimus* was processed in a similar way during the 180 days of the experiment, presenting ca. 65% of initial biomass after this period. Highest decomposition rates were observed for *S. alterniflora*, with 35% of initial biomass left after 180 days. *S.maritimus* was the species with the highest fungal diversity and this can be

related to the higher amount of nitrogen present in the biomass of this plant. However, the steady increase of N in detritus of this plant may have resulted from the incorporation of this nutrient by fungi that colonized the detritus.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

Os fungos são seres eucariontes heterótrofos; unicelulares ou multicelulares; microscópicos ou macroscópicos; com reprodução assexuada ou sexuada, resultando, neste último caso, na formação de esporos. Os fungos possuem parede celular constituída por quitina e  $\beta$ -glucano. Estes organismos se alimentam por absorção e apresentam glicogênio ou lipídeos como material de reserva energética (Kirk *et al.* 2001).

A sistemática dos fungos é bastante complexa e não completamente esclarecida. O reino Fungi inclui quatro filos: Chytridiomycota, Ascomycota, Zygomycota e Basidiomycota.

O filo Ascomycota tem sido relatado como predominante em ambientes aquáticos (Shearer *et al.* 2007), marinhos (Shearer *et al.* 2007, Jones *et al.* 2009, Hyde *et al.* (2000) e com muita matéria orgânica em decomposição (Nikolcheva & Bärlocher , 2004, Pearman *et al.* 2010).

Os fungos podem também ser caracterizados como filamentosos e unicelulares, ou leveduras. Fungos filamentosos apresentam o talo formado por hifas que, em conjunto, formam o micélio. A reprodução assexuada destes organismos se dá por fragmentação, ou pela produção de esporos, que são dispersos pelo vento e pela água (Alexopoulos *et al.* 1996). Fungos unicelulares, que apresentam reprodução assexuada por brotamento e sexuada por fusão de gametângios são denominados leveduras. Estes

organismos também podem apresentar a formação de pseudomicélio (Sidrim & Moreira, 1999, Alexopoulos *et al.* 1996).

Há grande diferença entre os fungos verdadeiramente aquáticos e os que podem ser encontrados em ambiente aquático. Os fungos verdadeiramente aquáticos dependem da água para reprodução, e possuem adaptações morfológicas especiais que lhes permitem a vida na água (Sparrow, 1968, Dick, 1970). Fazem parte deste grupo os fungos zoospóricos, os hifomicetos aquáticos e as leveduras aquáticas (Dix & Webster, 1995).

Por outro lado, fungos de origem terrestre, denominados geofungos, podem ser carregados para o ambiente aquático por meio de ventos, lixiviação, adesão a substratos orgânicos alóctones, entre outros. Estes se estabelecem, com bastante frequência, em substratos orgânicos submersos, ou utilizam a água como veículo de transporte para suas unidades de dispersão (Sparrow, 1968, Dick, 1970). Fungos terrestres encontrados em ambientes aquáticos são denominados de fungos imigrantes e os que podem alternar periodicamente diferentes fases do ciclo de vida entre os ambientes aquático e terrestre de migrantes. Enquanto os chamados versáteis, são geofungos que conseguem sobreviver nestes ambientes e que utilizam a água como meio de transporte para dispersão, podendo fixar-se e decompor substratos orgânicos submersos. Os geofungos não adaptados ao ambiente aquático e que tem uma diminuição de sua atividade metabólica após submersão, são chamados transientes (Park 1972, Dick 1976, Dix & Webster 1995).

As leveduras aquáticas têm elevada produção de enzimas e são capazes de degradar vários tipos de substratos (Alexopoulos *et al.* 1996). Algumas representantes deste grupo são sensíveis às variações ambientais

causadas pela presença de poluentes, mas também existem leveduras mais resistentes, assemelhando-se a alguns fungos terrestres (Schoenlein-Crusius & Milanez 1996).

Os fungos marinhos formam um grupo ecológico e não um grupo taxonômico (Hyde *et al.* 2000). Fungos marinhos obrigatórios crescem e esporulam exclusivamente em água do mar, e os esporos são capazes de germinar neste ambiente. Por outro lado, os fungos marinhos facultativos, são provenientes de ambientes límnicos, ou do meio terrestre, e que possuem adaptações fisiológicas, o que permite que eles cresçam e possivelmente também esporulem no meio marinho (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979).

De maneira geral, a comunidade de fungos encontrados na água é composta, predominantemente, de fungos zoospóricos, hifomicetos aquáticos (principalmente em substratos submersos), alguns representantes de basidiomicetos (geralmente fases de reprodução sexuada), ascomicetos (incluindo fases de reprodução sexuada) e quantidades variadas de fungos de origem terrestre e leveduras (Sparrow, 1968, Dick, 1970).

Os fungos são ubíquos e altamente diversos. O número total de espécies estimadas varia entre 0,7-1,5 milhões, das quais apenas 120.000 espécies já estão descritas (Hawksworth, 2001, Schmit & Mueller, 2007). Ao longo do tempo estes organismos desenvolveram diversas formas de vida que possibilitam a eles habitar ecossistemas terrestres e aquáticos, incluindo as mais extremas condições ambientais, tais como zonas polares (Hawksworth & Mueller, 2005), fontes hidrotermais (López-García *et al.* 2006, Burgaud. *et al.* 2009, Le Calvez *et al.* 2009), além de ecossistemas anóxicos e hipersalinos (Alexander *et al.* 2009).

A importância dos fungos para o funcionamento dos ecossistemas é amplamente conhecida, uma vez que estes são decompositores de matéria orgânica e possuem grande capacidade de degradação de resíduos (Kjøller & Struwe 1992, Moore-Landecher 1996). A capacidade de sintetizar enzimas faz dos fungos participantes ativos na decomposição da matéria orgânica e na ciclagem de nutrientes sendo, por isso, importantes para a cadeia alimentar detritívora (Christensen, 1989). Os fungos são organismos com maior atividade sapróbia em ambientes terrestres e aquáticos e são fundamentais na ciclagem de elementos essenciais, mineralização, acumulação de materiais tóxicos e desintoxicação ambiental (Barlocher & Kendrick 1974, Christensen 1989).

Nos ecossistemas aquáticos, os fungos são também importantes em outros processos ecológicos como, por exemplo, o controle de comunidades microbianas (“top-down”) e pelo parasitismo, principalmente de fitoplâncton, e nutrição de zooplâncton, que podem alimentar-se das formas de vida livre destes organismos (Jobard *et al.* 2010a, Rasconi *et al.* 2011, Sime-Ngando *et al.* 2011).

Os fungos marinhos são comumente encontrados durante a decomposição e formação de detritos de plantas em águas costeiras (Kohlmeyer e Kohlmeyer 1979; Newell, 1996; Hyde *et al.*, 2000;. Raghukumar, 2004, Sridhar, 2005), mas também são encontrados em conchas calcárias (Raghukumar *et al.* 1992), algas (Raghukumar, 2006) e corais (Golubic *et al.* 2005). Também têm sido isolados de sedimentos no fundo do mar (Damare *et al.* 2006), até mesmo de sedimentos marinhos anóxicos (Stoeck *et al.* 2003).

Cerca de 500 espécies de fungos já foram descritas em habitats marinhos (Kis-Papo, 2005), com uma grande maioria das leveduras

pertencentes ao filo Ascomycota (por exemplo, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, e *Saccharomyces*), que são comuns em águas rasas, enquanto os fungos que pertencem ao filo Basidiomycota são mais comuns em águas profundas (Munn, 2004). A distribuição de fungos marinhos é influenciada por vários fatores, como temperatura da água (Hughes, 1974) salinidade (Booth& Kenkel 1986) e disponibilidade de substrato (Jones, 2000).

No Brasil, os trabalhos de diversidade de fungos e leveduras em ambientes aquáticos ainda são escassos. A respeito de leveduras em ambiente de água doce, Medeiros *et al.* (2008) conduziram um trabalho na região Sudeste para verificar a diversidade e susceptibilidade á antifúngicos de leveduras de ambientes tropicais. Estes autores isolaram 134 espécies de leveduras da água e do sedimento. O gênero *Candida* foi o que apresentou o maior número de espécies, com a presença de patógenos oportunistas, como *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*.

Quanto aos fungos filamentosos, a maioria dos estudos conduzidos em ambientes de água doce no Brasil referem-se a colonização destes organismos em substratos vegetais (principalmente folhas) submersos, observando-se a presença de geofungos e fungos zoospóricos (Schoenlein-Crusius & Milanez 1989, 1998, Schoenlein-Crusius *et al.* 1990, 1992, Pires-Zottarelli *et al.* 1993, Moreira, 2006).

Os estudos mais recentes sobre os fungos em ambientes marinhos no Brasil foram, na sua maioria, conduzidos em praias turísticas e tiveram como objetivo a avaliação sanitária destes locais. Por exemplo, Gomes *et al.* (2008) isolaram e identificaram fungos filamentosos da areia e da água das praias de Casa Caiada e Bairro Novo, principais praias de Olinda, Pernambuco. Neste

estudo foram isoladas e identificadas 57 espécies de fungos, correspondentes a 20 gêneros. *Aspergillus* e *Penicillium*, dominaram tanto no solo quanto na água, com um total de 11 e 19 espécies, respectivamente. Loureiro *et al.* (2005) isolaram e identificaram leveduras nestas mesmas praias, onde espécies do gênero *Candida* (*Candida catenulata*, *C. fenica*, *C. sake*) e *Rhodotorula mucilaginosa* foram as espécies mais comumente encontradas. E Oliveira *et al.* (2011) estudaram fungos filamentosos de amostras de água e solo da praia de Candeias, Pernambuco, obtendo 57 espécies de fungos filamentosos correspondentes a 19 gêneros fúngicos. *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais abundantes. Estes autores apresentaram duas novas ocorrências de fungos para a América Latina no Nordeste brasileiro, que são *Penicillium diversum* e *Varicosporium elodeae*.

A região estuarina da Lagoa dos Patos, RS, com uma área de 971 km<sup>2</sup>, apresenta elevadas taxas de produtividade primária e uma considerável diversidade biológica (Seeliger *et al.* 1998). Esta região serve como área de reprodução e berçário para muitas espécies marinhas, que encontram neste ambiente proteção e disponibilidade de alimentos. Neste ecossistema a maior parte da matéria e energia fixada pelos produtores primários é canalizada para níveis tróficos superiores através da cadeia alimentar detritívora, onde a biomassa de plantas superiores é decomposta por microrganismos (Seeliger *et al.* 1998).

Os fungos desempenham um papel chave na decomposição e transformação bioquímica das macrófitas, atuando de duas maneiras: A primeira seria a ação de suas enzimas degradativas, pois grande parte do material é altamente resistente ao ataque microbiano (Hodson *et al.* 1983). Em

segundo lugar, os fungos podem desempenhar um papel importante na imobilização de nitrogênio, através da conversão de nitrogênio inorgânico em biomassa fúngica, resultando assim numa diminuição da proporção CN do detrito e na melhoria de sua qualidade nutricional (Fell & Newell, 1981). Além disso, a presença dos fungos na produção detritica pode tornar o detrito mais palatável aos organismos detritívoros (Rietsma *et al.* 1988).

A despeito da potencial importância dos fungos na cadeia detritívora de ambientes com alta produtividade primária, não foram realizados estudos sobre a ecologia destes organismos no estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente. Nestes ambientes são escassas as informações sobre a abundância e diversidade de fungos e leveduras. Existe apenas o trabalho de Mendoza *et al.* (no prelo), que teve como objetivo o isolamento de gêneros patogênicos. Com relação aos fungos presentes na região de marisma do estuário da Lagoa dos Patos, temos apenas o estudo de Hickenbick *et al.* (2004) que observaram durante a decomposição de três espécies de macrófitas aquáticas na região estuarina da Lagoa dos Patos, uma grande quantidade de esporos de fungos não identificados nas amostras analisadas.

A presente Tese, estruturada em três capítulos, pretende contribuir para o conhecimento sobre identificação de fungos e leveduras na água do estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente, e o papel destes organismos fungos no processo de decomposição das macrófitas emergentes de marismas, *Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora* e *Scirpus maritimus* deste estuário.

No capítulo I, "Fungos no estuário da Lagoa dos Patos e Praia do Cassino, Rio Grande, RS", Brasil, foi avaliada a variabilidade espacial e

temporal de fungos nas águas da região estuarina da Lagoa dos Patos e Praia do Cassino, com amostras de água que foram coletadas mensalmente em três estações distribuídas entre o estuário da Lagoa dos Patos e a região costeira adjacente, no período de Março de 2007 à Junho de 2008.

No capítulo II, “Variação espacial e temporal de fungos e leveduras no estuário da Lagoa dos Patos e Praia do Cassino, Rio Grande, RS, Brasil”, conduzido no período de Junho de 2009 à Junho de 2010, foi dada continuidade às análises do capítulo I, com adição da variável abiótica material particulado em suspensão (MPS) e identificação das leveduras isoladas em nível de espécie através do sistema automatizado Vitek II®.

No capítulo III, “Colonização de fungos durante a decomposição de três espécies de macrófitas em um marisma do estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande, RS, Brasil”, foi avaliada a colonização fúngica e concentração de carbono e nitrogênio durante a decomposição de *S. alterniflora*, *S. densiflora* e *S. maritimus*, através de “litter-bags” que foram depositados em uma marisma no estuário da Lagoa dos Patos, e retirados para análises nos períodos de 7, 15, 30, 90, 180 dias após o início do experimento

## **OBJETIVOS E HIPÓTESES DE TRABALHO**

### ***Hipóteses***

- 1) Os grupos dominantes no estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente são os Ascomycetos.,
- 2) A distribuição fúngica da região apresenta uma marcada variação espacial em função das condições ambientais (principalmente salinidade) no estuário da Lagoa dos Patos e praia do Cassino;

- 3) Na colonização fúngica durante o processo de decomposição de macrófitas no estuário da Lagoa dos Patos destacam-se fungos Ascomycota e Basidiomycota e com influência da composição química das plantas estudadas.

### ***Objetivo Geral***

Avaliar a variação espacial e temporal de fungos e leveduras na água da região estuarina da Lagoa dos Patos e Praia do Cassino e a colonização destes microrganismos durante o processo de decomposição de macrófitas aquáticas na região estuarina.

### ***Objetivos Específicos***

- 1) Identificar as principais espécies de fungos e leveduras, através de amostras de água coletadas no estuário da Lagoa dos Patos e Praia do Cassino.
- 2) Caracterizar, experimentalmente, a colonização de fungos na decomposição de macrófitas aquáticas na região estuarina da Lagoa dos Patos;

### **REFERÊNCIAS**

- ALEXANDER, E, STOCK, A, BREINER, HW, BEHNKE, A, BUNGE, J, YAKIMAV,MM, STOECK, T. 2009. Microbial eukaryotes in the hypersaline anoxic L'Atalante deep-sea basin. *Environ Microbiol.*, 11: 360– 381.
- ALEXOUPoulos, CJ, MIMS, CW, BLACKWELL, M. 1996. *Introductory Micology*. 4th. ed. New York. John Wiley & Sons. 868p.

- BÄRLOCHER, F, KENDRICK, B. 1974. Dynamics of the fungal population on leaves in a stream. *J. Ecol.*, London, 62 (3): 761-791.
- BOOTH, T, KENKEL, NC 1986 – Ecological studies of lignicolous marine fungi: a distribution model based on ordination and classification. In: *The Biology of Marine Fungi* (ed ST Moss). Cambridge University Press, Cambridge, UK, 297–310.
- BURGAUD, G, LE CALVEZ, T, ARZUR, D, VANDENKOORNHUYSE, P, BARBIER, G. 2009. Diversity of culturable marine filamentous fungi from deep-sea hydrothermal vents. *Environ Microbiol.*, 1:1588–1600.
- DICK, MW. 1976. The ecology of aquatic Phycomycetes. In: Gareth Jones, EB. (ed.). *Recent advances in aquatic mycology*. Elek Science, London, pp. 513-542.
- CHRISTENSEN, M. 1989. A view of fungal ecology. *Mycologia*, 81 (1): 1-19.
- DAMARE, S, RAGHUKUMAR, C, MURALEEDHRAN, UD, DIX, NJ, WEBSTER, J. 1995. *Fungal Ecology*. Cambridge: Chapman & Hall. 549 p.
- FELL, JW, NEWELL, SY. 1981. Role of fungi in carbon flow and nitrogen immobilization in coastal marine plant litter systems. In: Wicklow, D.T., Carroll. G.C. (Eds.), *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 665-678.
- GOLUBIC, S., RADKE, G, LE-CAMPION-ALSUMARD, T. 2005. Endolithic fungi in marine ecosystem. *Trends Microbiol.*, 13: 229-235.
- GOMES, DNF, CAVALCANTI, M.AQ, FERNANDES, MJS, LIMA, DMM, PASSAVANTE, JZO. 2008. Filamentous fungi isolated from sand and water of “Bairro Novo” and “Casa Caiada” beaches , Olinda, Pernambuco. Brazil. *Braz. J. Biol.*, 68 (3): 577-582.

- HAWKSWORTH, DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res.*, 105:1422–1432.
- HODSON, RE, BENNER, R, MACCUBBIN, AE. 1983. Transformations and fate of lignocellulosic detritus in marine environments. *Biodeterior.*, 5: 185-195.
- HICKENBICK, GR, FERRO, AL, ABREU, PC. 2004. Produção de detritos de macrófitas emergentes em uma marisma do estuário da Lagoa dos Patos: taxasi de decomposição e dinâmica microbiana. *Atlântica.*, Rio Grande; 26: 61-75.
- HYDE, KD, SARMA, VV, JONES, EBG. 2000. Morphology and taxonomy of higher marine fungi. In: *Marine Mycology- A Practical Approach* (eds. K.D. Hyde and S.B. Pointing), *Fungal Divers. Res. Ser.*, 1: 172-204.
- HUGHES, GC. 1974 – Geographical distribution of the higher marine fungi. *Veroffentlichungen des Instituts fuer Meeresforschung Bremerhaven Suppl* 5, 419–441.
- JOBARD, M, RASCONI, S, SIME-NGANDO, T. 2010. Diversity and functions of microscopic fungi: a missing component in pelagic food webs. *Aquat. Sci.*, 72:255–268.
- JONES, EBG. 2000. Marine fungi: some factors influencing biodiversity. *Fungal Divers.*, 4: 53–73.
- KJOLLER, A, STRUWE, S. 1992. Functional groups pf microfungi in decomposition. In: *Caroll & Wicklow (eds.). The fungal community: its organization and role in the ecosystem.* 2ed. New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 619-630.
- KIRK, PM, CANNON, PF, DAVID, JC, STALPERS, JA. 2001. *Dictionary of the Fungi.* 9th , Cabi Publishing. 653p.

- KIS-PAPO, T. 2005. Marine fungal communities. In: Dighton J, White JF, Oudemans P (eds) *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*, 3rd edn. CRC Press, Boca Raton, 61–92.
- KOHLMEYER, J, KOHLMEYER, E. 1979. *Marine Mycology. The Higher Fungi*. Academic Press, New York.
- LE CALVEZ, T, BURGAUD, G, MAHE, S, BARBIER, G, VANDENKOORNHUYSE, P. 2009. Fungal diversity in deep sea hydrothermal ecosystems. *Appl Environ Microbiol.*, 75:6415–6421
- LÓPEZ-GARCIA, P, VERESHCHAKA, A, MOREIRA, D. 2006. Eukaryotic diversity associated with carbonates and fluid–seawater interface in Lost City hydrothermal field. *Environ Microbiol.*, 9:546–554.
- LOUREIRO, STA, CAVALCANTI, M.AQ, NEVES, RP, PASSAVANTE, JZO. 2005. Yeasts isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco state, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 36: 333-337
- MEDEIROS, AO, KOHLERA, LM, HAMDANA, JS, MISSAGIA, BS, BARBOSA, FAR, ROSA, CA. 2008. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil 2008. *water research* 4 (2) : 3 9 2 1 – 3 9 2 9.
- MENDOZA-SASSI, RA, COSTA, CFS, SCAINI, CJ, ALMEIDA, PES, GATTI, FAA, SILVEIRA, ES, MATA, MM, HALLAL, E, GIOIA, CC, RAMOS, DF, FALCHI, LR, GUIMARÃES, FM, RAMOS, T, SOUZA, D, LOBATO, R, SOUZA, NC, MARTINEZ, AMB. “Microrganismos patogênicos em amostras de água no porto de Rio Grande: Um problema de saúde pública.” *Vittalle: Revista de Ciências da Saúde* – ISSN impresso 1413-3563 e ISSN online 2177-7853

- MOORE-LANDECHER, E. 1996. *Fundamentals of the fungi*. 4th. ed., New Jersey: Prentice-Hall. 574 p.
- MOREIRA, CG. 2006. Sucessão de fungos (Hyphomycetes aquáticos e geofungos) associados à decomposição de folhas de *Tibouchina pulchra* Cogn. submersas em um riacho da Mata Atlântica. São Paulo. Monografia, Universidade de Santo Amaro, 48 p.
- MUNN, CB. 2004. *Marine microbiology—ecology and applications*. Bios-Garland Scientific, New York.
- NEWELL, SY. 1996. Established and potential impacts of eukaryotic mycelial decomposers in marine/terrestrial ecotones. *J. Exp. Mar.*, 200: 187-206.
- OLIVEIRA, LG, CAVALCANTI, MAQ, PASSAVANTE, JZO, FERNANDES, MJS, LIMA, DMM. 2011. Filamentous fungi isolated from Candeias Beach, Pernambuco, Brazil. *Hoehnea.*, 38 (2): 215-220.
- RIETSMA, CS, VALIELA, I, BUCHSBAUM. 1988. Detrital chemistry, growth, and food choice in the salt-marsh snail (*Melampus bidentatus*). *Ecology* 69, 261-266.
- PARK, D. 1972. On the ecology of heterotrophic micro-organisms in freshwater. *Transactions of the British Mycological Society*, 58 (2): 291-299.
- PIRES-ZOTARELLI, CLA, MILANEZ, AI, SCHOENLEIN-CRUSIUS, IH. 1993. Quantitative estimation of zoospore-forming fungi and aquatic hyphomycetes on leaves submerged in a stream in the Atlantic rain forest, in the State of São Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Microbiol.*, 24: 192-197.
- RAGHUKUMAR, C, RAGHUKUMAR, S, SHEELU, G, GUPTA, SM, NATH, BN, RAO, BR. 2004. Buried in time: culturable fungi in a deep-sea sediment

- core from the Chagos Trench, Indian Ocean. *Deep-Sea Res.,-I* 51: 1759-1768.
- RAGHUKUMAR, C, NAGARKAR, S, RAGHUKUMAR, S. 1992. Association of thraustochytrids and fungi with living marine algae. *Mycol. Res.*, 96: 542-546.
- RAGHUKUMAR, C. 2006. Algal-fungal interactions in the marine ecosystem: symbiosis to parasitism. In: *Recent Advances on Applied Aspects of Indian Marine Algae with Reference to Global Scenario, Vol. I* (ed. A. Tewari), Central Salt and Marine Chemicals Research Institute, Bhavnagar: 366-385.
- RAGHUKUMAR, S. 2006. Deep-sea fungi as a source of alkaline and cold-tolerant proteases. *Enzyme. Microb. Technol.*, 39: 172-181.
- RASCONI, S, JOBARD, M, SIME-NGANDO, T. 2011. Parasitic fungi of phytoplankton: ecological roles and implications for microbial food webs. *Aquat Microb Ecol* 62: 123– 137.
- SEELIGER, U, ODEBRECHT, C, CASTELO, JP. 1998. Os Ecosistemas Costeiros e Marinho do Extremos Sul Do Brasil. Rio Grande, RS. Ed. Ecoscientia. 341p.
- SCHOENLEI-CRUSIUS, IH, MILANEZ, AI. 1996. Diversity of aquatic fungi in Brazilian Ecosystems. In: Bicudo, C. & Menezes, N. A. (eds.). *Biodiversity in Brazil: a first approach*. CNPq, São Paulo, 31-48.
- SCHOENLEI-CRUSIUS, IH, MILANEZ, AI. 1989. Sucessão fúngica em folhas de *Ficus microcarpa* L. f. submersas no lago frontal situado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, *Rev. Microbiol.*, 20(1): 95-101.

- SRIDHAR, KR. 2005. Diversity of fungi in mangrove ecosystems. In: Microbial Diversity: Current Perspectives and Potential Applications (eds. T. Satyanarayana and B.N. Johri) I.K. International Pvt. Ltd., New Delhi: 129-147.
- SCHMIT, JP, MUELLER, GM. 2007. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodivers. Conserv.*, 16:99–111.
- SIDRIM, JJC, MOREIRA, JLB. 1999. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 287p.
- SIME-NGANDO, T, LEFÈVRE, E, GLEASON, FH. 2011. Hidden diversity among aquatic heterotrophic flagellates: ecological potentials of zoosporic fungi. *Hydrobiologia* 659: 5–22.
- STOECK, T, TAYLOR, GT, EPSTEIN, S. 2003. Novel eukaryotes from the permanently anoxic Cariaco Basin (Caribbean Sea). *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 5656-5663.

## CAPÍTULO I

### FUNGOS NO ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS E PRAIA DO CASSINO, RIO GRANDE-RS, BRASIL\*.

\* Trabalho submetido para publicação na Revista Atlântica

#### RESUMO

O presente trabalho avaliou a variabilidade espacial e temporal fungos nas águas da região estuarina da Lagoa dos Patos e Praia do Cassino. Amostras de água foram coletadas mensalmente em três estações distribuídas entre o estuário da Lagoa dos Patos e a região costeira adjacente. A presença dos fungos e leveduras foi avaliada por cultivos de amostras de água em meio de cultura ágar Sabouraud com cloranfenicol. Variáveis ambientais como temperatura da água, salinidade, pH, transparência (Disco de Secchi) e nutrientes inorgânicos dissolvidos (fosfato, amônia, nitrito e nitrato) também foram analisados. Os gêneros *Aspergillus* *Penicillium* , e os agrupamentos de fungos não esporulados e leveduras foram os mais freqüentes durante o estudo. O local que mostrou maior número de isolados foi Museu, enquanto que a Praia e Barra apresentaram-se similares. A maior frequência dos gêneros *Penicillium* , e *Aspergillus* , e fungos não esporulados foi no local Museu, em abril, maio e setembro de 2007, respectivamente. Leveduras foi o principal grupo isolado na Praia, com o maior número de isolados verificado em junho de 2007. A distribuição dos fungos foi afetada principalmente pela salinidade e concentrações de amônia e fosfato.

Palavras-chave: fungos, leveduras, estuário da Lagoa dos Patos

## INTRODUÇÃO

Os fungos são seres eucarióticos, micro ou macroscópicos, unicelulares ou filamentosos, com parede celular composta de quitina e que se reproduzem de forma assexuada e/ou sexuada, estando presentes nos ambientes terrestre e aquático. Classificam-se como seres heterotróficos, com nutrição absorptiva saprofágica (Alexopoulos *et al.* 1996).

Os fungos presentes na água têm distribuição ubíqua, mas diferenciada quanto a distribuição geográfica e os substratos onde são encontrados (Jones, 1997; Gareth *et al.* 2006). Entretanto, há grande diferença entre os fungos verdadeiramente aquáticos e os que podem ser encontrados neste ambiente. Os fungos verdadeiramente aquáticos dependem da água para reprodução e possuem adaptações morfológicas especiais, tais como flagelos, que lhes permitem a vida neste ambiente (Sparrow 1968, Dick 1970).

Por outro lado, fungos de origem terrestre, denominados geofungos, podem ser carregados para o ambiente aquático por meio de ventos, lixiviação, adesão a substratos orgânicos alóctones, entre outros. Estes se estabelecem, com bastante frequência, em substratos orgânicos submersos, ou utilizam a água como veículo de transporte para suas unidades de dispersão (Sparrow 1968, Dick 1970).

Os fungos têm um papel fundamental na manutenção dos ecossistemas, considerando-se sua atividade de decomposição da matéria orgânica e reciclagem de nutrientes. Estes organismos são importantes também na melhoria da qualidade nutricional de substratos orgânicos consumidos por organismos detritívoros. Alguns fungos têm a capacidade de remover ou degradar poluentes orgânicos e inorgânicos, agindo como depuradores da

água (Schoenlein-Crusius *et al.* 2004). Desta forma, estudos associados à identificação de fungos representam não só um maior conhecimento da biodiversidade, como se caracterizam como uma alternativa para obtenção de bioprodutos e processos biotecnológicos (Vasconcelos *et al.* 2003).

Na América do Sul é escassa a informação que se tem a respeito de diversidade de fungos aquáticos, especialmente em ambientes marinhos. Com relação a ambientes costeiros no Brasil, existem poucos estudos que relatam a ocorrência de fungos (Silva *et al.* 2003, Gomes *et al.* 2008) e leveduras (Faraco & Faraco, 1960, Queiroz, 1972, Loureiro *et al.* 2005) nestes ambientes.

A região estuarina da Lagoa dos Patos, RS, com uma área de 971 km<sup>2</sup>, apresenta elevadas taxas de produtividade primária e uma considerável diversidade biológica (Seeliger *et al.* 1998). Esta região serve como área de reprodução e berçário para muitas espécies marinhas, que encontram neste ambiente proteção e disponibilidade de alimentos. Neste ecossistema predomina a cadeia alimentar detritívora, onde a biomassa de plantas superiores é decomposta por microrganismos, tornando a matéria e energia das plantas disponível a organismos aquáticos consumidores de detritos (Seeliger *et al.* 1998). Em alguns estudos realizados sobre a ecologia de bactérias e protozoários nesta região. Abreu *et al.* (1992), revelaram que a dinâmica da comunidade bacteriana é determinada por fatores biológicos, como a produção primária do fitoplâncton e a herbivoria exercida por protozoários. Brepohl *et al.* (1996) acompanharam a variação de biomassa de microrganismos (bactérias, flagelados e ciliados) durante o processo de degradação de folhas de *Scirpus maritimus*, medindo a influência da matéria orgânica dissolvida liberada sobre a comunidade de bactérias livres e aderidas

a partículas. Entretanto, a única informação sobre fungos presentes na água desta região está reportada em Hickenbick *et al.* (2004), que observaram uma grande quantidade de esporos de fungo durante o estudo da decomposição de três espécies de macrófitas aquáticas na região estuarina da Lagoa dos Patos.

Apesar do grande potencial biotecnológico, e da evidente importância ecológica de fungos e leveduras no processo de decomposição em ambientes aquáticos, pouco se sabe a respeito da diversidade e ação destes microrganismos no Brasil, e em especial no estuário da Lagoa dos Patos. Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar a composição e variabilidade espacial e temporal da comunidade de fungos e leveduras no estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente (Praia do Cassino) e identificar os possíveis fatores controladores de sua variabilidade.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Local do estudo***

Foram escolhidas 2 (duas) estações de coleta no estuário da Lagoa dos Patos (molhes da Barra e Yacht Clube-Museu de Rio Grande) e 1 (uma) estação na Praia do Cassino (Figura 1). Nestas estações foram realizadas coletas mensais no período de março de 2007 a junho de 2008, excetuando os meses de julho e agosto de 2007 e fevereiro e março de 2008, nos quais as coletas para identificação de fungos não foram efetuadas. Em cada ponto foram coletadas três amostras de 500 ml de água, sendo utilizados frascos de vidro esterilizados com boca larga (5 cm de diâmetro) e tampa, modelo Wheaton. Cada frasco foi submergido rapidamente com a boca para baixo, 30

cm abaixo da superfície. Os locais e as coleta acompanharam o PELD (Programa Ecológico de Longa Duração)

Os dados abióticos como temperatura da água, temperatura do ar (termômetro Incoterm -1°C – 100°C), salinidade (Hand Refractometer ATAGO S0 MILL/-E salinity 0 ~ 100), pH (Phmetro DIGIMED DMPH-3) e transparência da água (Disco de Secchi) registrados no momento de cada coleta e as análises das concentrações dos nutrientes fosfato, nitrato+nitrito (Strickland & Parsons,1972) e amônia (UNESCO, 1983), foram gentilmente cedidos pelo PELD (Programa Ecológico de Longa Duração).

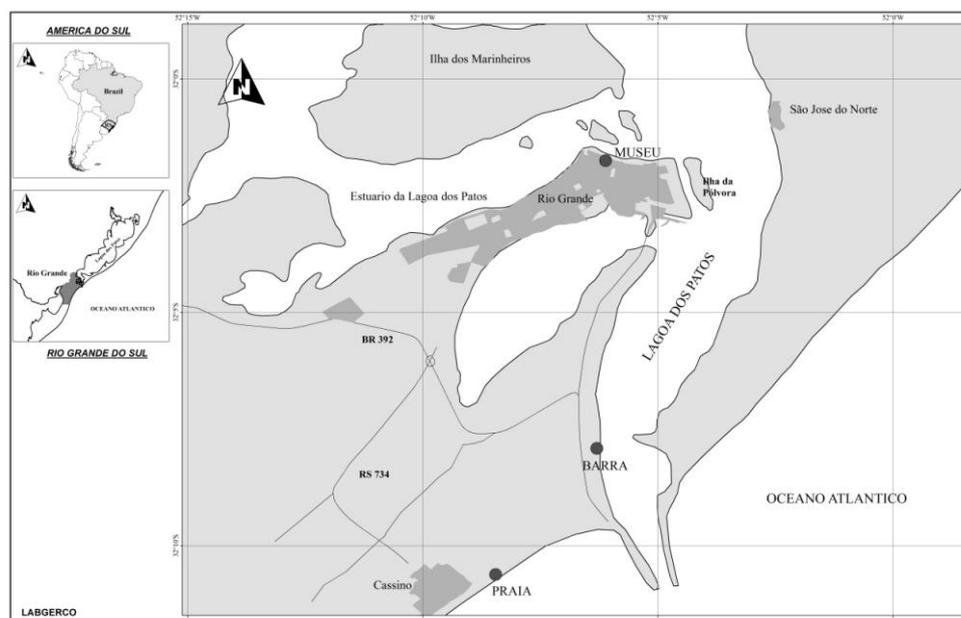


Figura 1. Localização dos locais de amostragem: Museu, Barra e Praia

### ***Isolamento de Fungos e Leveduras das amostras***

Após a coleta foi realizada centrifugação da amostra de água (500 mL), separadas em alíquotas de 50 ml, a 4500 rpm por 10 minutos, para a concentração do material em suspensão. Posteriormente, o material

concentrado foi diluído em PBS (Phosphate Buffer Solution) pH 7,2, nas proporções de 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4 (Busta *et al.* 1984).

O cultivo dos fungos foi realizado utilizando-se 1 mL da água da amostra de água diluída nas proporções acima em 90 ml de PBS (Phosphate Buffer Solution) pH 7,2, com diluições seriadas (decimais) até  $10^{-4}$ , empregando-se o mesmo diluente. Alíquotas de 10  $\mu$ l de cada diluição foram espalhadas na superfície de placas contendo meio ágar Sabouraud acrescido de Cloranfenicol (Acumedia), e colocados em estufa bacteriológica a 25°C (Busta *et al.* 1984). Esta operação foi repetida em duplicata para cada diluição. Os cultivos foram observados diariamente por até 07 (sete) dias.

A identificação dos fungos filamentosos em nível de gênero, foi baseada nas características de macro e de micromorfologia dos fungos que crescerem nos meios. Além destas características, foram também observados, a velocidade de crescimento (tempo da semeadura até visualização inicial da colônia), aspecto superficial do micélio e pigmentação do verso e reverso dos cultivos (Alexopoulos *et al.* 1996, Barnett & Hunter, 1998, Putzke & Putzke, 2002). As características micromorfológicas foram observadas utilizando-se a Técnica de Microcultivo (Ridel, 1950).

As leveduras foram identificadas pela sua forma estrutural, não sendo classificadas em gênero.

### **Análise Estatística**

Foi feita a comparação das médias de todas as variáveis bióticas e abióticas entre dois períodos (abril, maio e junho de 2007 e abril, maio e junho de 2008), utilizando o teste t. Para testar a associação entre o número de

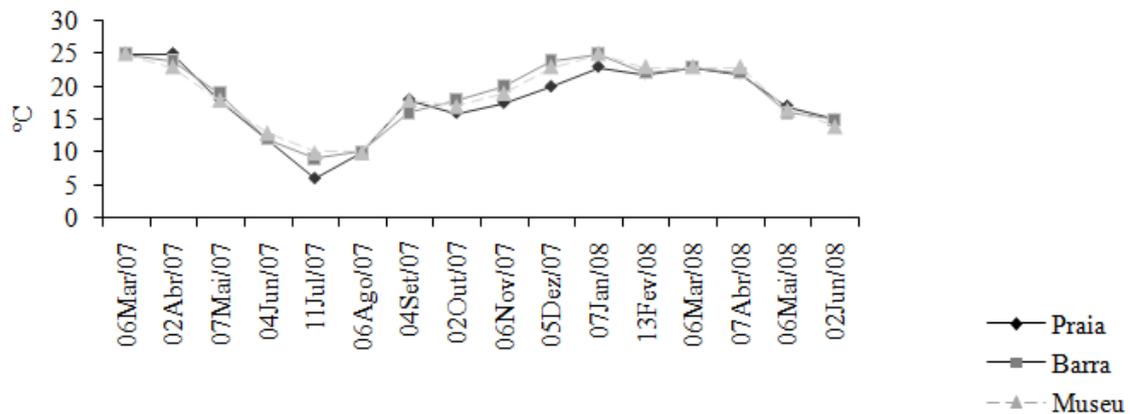
gêneros e número de isolados por gêneros e variáveis abióticas durante todo o período aplicamos um modelo de regressão múltipla Stepwise forward. Foram observadas as premissas do modelo de homogeneidade de variância e normalidade dos resíduos (Zar, 1996, Hammer *et al.* 2001).

## **RESULTADOS**

A temperatura da água foi semelhante nas três estações de coleta e mostrou um padrão sazonal , com valores menores (5 ° C) em julho de 2007 e o mais alto (25 ° C) em janeiro de 2008 (Figura 2A).

A salinidade variou de acordo com a localização geográfica de cada local de amostragem. As maiores diferenças durante o período experimental foram encontradas entre os locais de coleta Barra e Museu, onde a salinidade variou de 0 a 33. Os maiores valores foram medidos no Outono de 2007 e Verão 2008. Na estação da Praia a salinidade variou de 20 a 33, não mostrando grande variabilidade (Figura 2B).

(A)



(B)

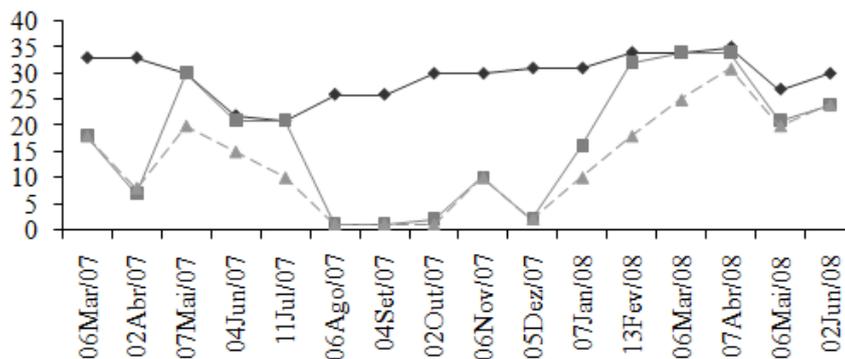


Figura 2. Variações de temperatura da água (A) e salinidade (B) durante o período experimental.

Os níveis de pH mantiveram-se estáveis ao longo do estudo, com uma ligeira variação em cada local de amostragem (7,0-8,2) (Figura 3A).

Os menores valores de profundidade do disco de Secchi foram observados no local Praia, onde o maior valor foi de 60 cm em abril de 2008. Os locais Barra e Museu apresentaram variações semelhantes de valores de penetração de luz. O maior valor para a Barra foi em março de 2007 (200 cm) e o menor (5 cm) em outubro de 2007. O local Museu teve maior valor em

fevereiro e março de 2008 ( 200cm), e menor em janeiro e abril de 2008 (5 cm) (Figura 3B).

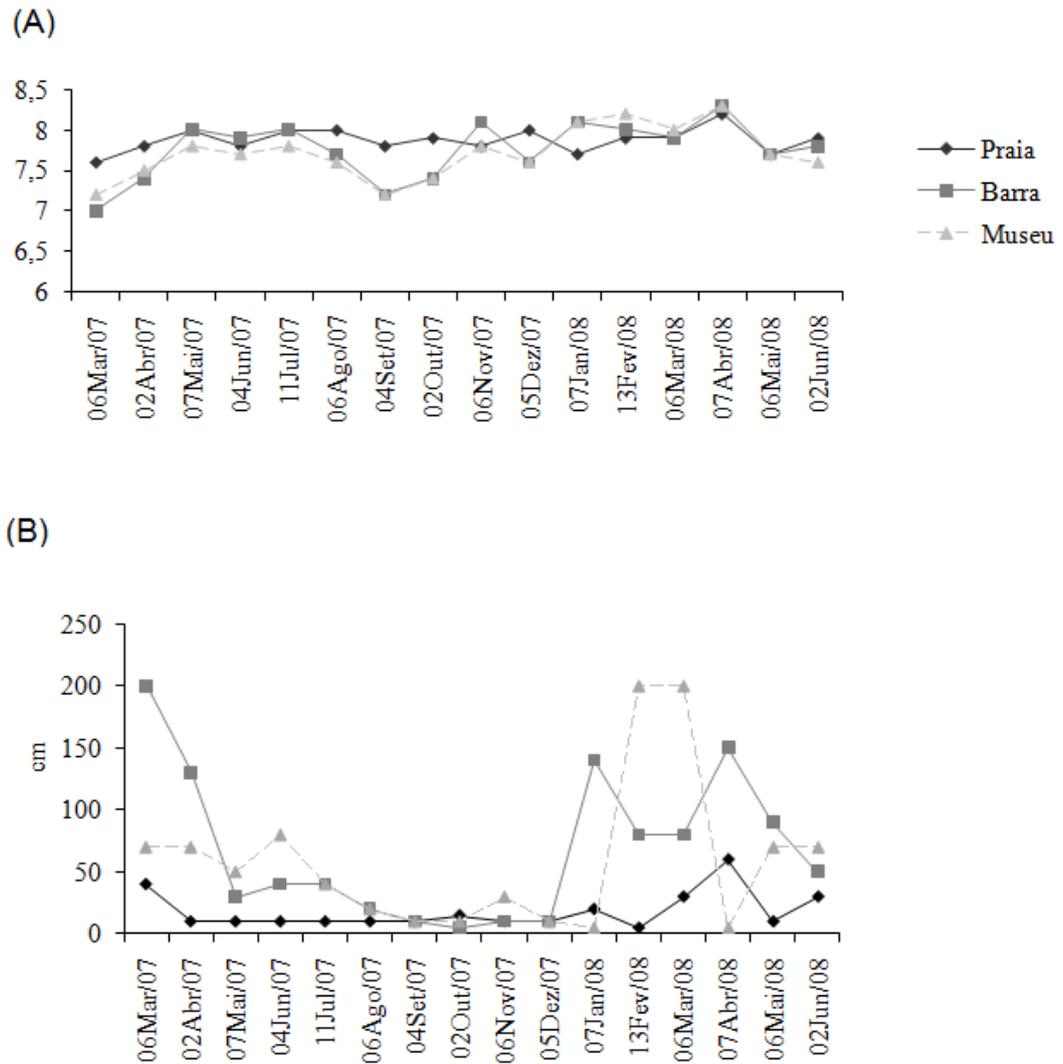


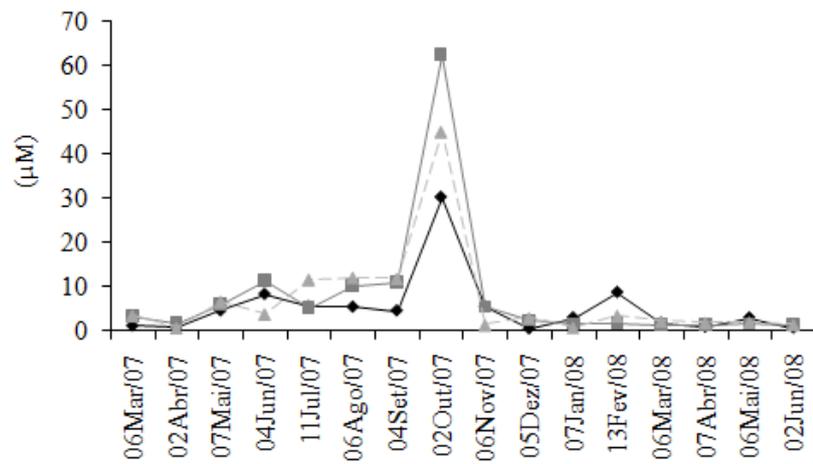
Figura 3. Variações de pH (A) e Secchi (B) durante o período experimental.

As concentrações de amônia foram semelhantes nos três locais de amostragem, com maior valor (65  $\mu\text{M}$ ) medido em outubro de 2007 no local Barra (Figura 4A). As concentrações de nitrito+nitrato foram baixas no local Praia, exceto para a amostra de setembro de 2007, que atingiu 15  $\mu\text{M}$ . A Barra

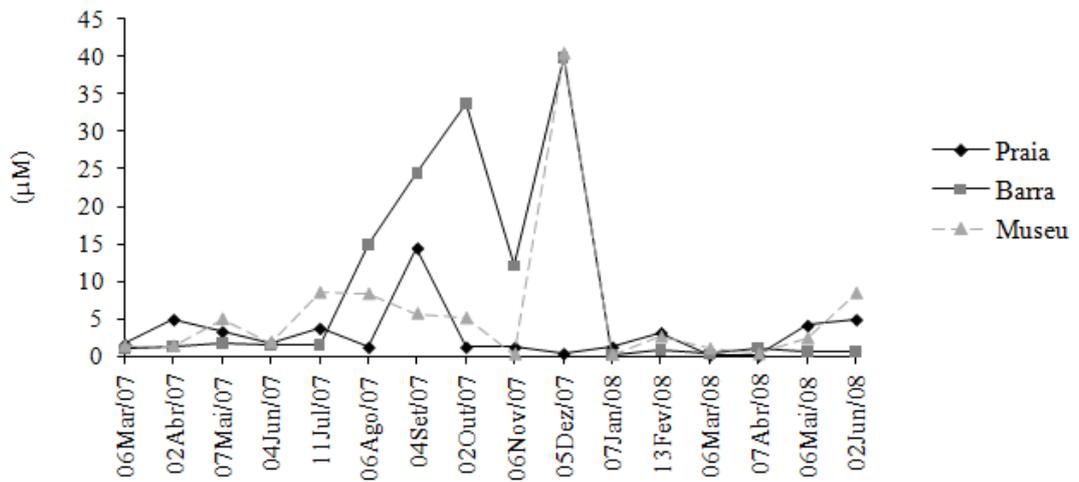
apresentou altos níveis de nitrito+nitrato entre agosto e dezembro de 2007. No local Museu a concentração mais elevada destes nutrientes (40  $\mu\text{M}$ ) foi também medida em Dezembro de 2007 (Figura 4B).

As concentrações de fosfato apresentaram padrões diferentes para cada local. No local Praia o fosfato variou entre 0,75 e 2,0  $\mu\text{M}$ , com máximo em outubro de 2007. O local Barra também mostrou variações elevadas, com valores entre 0,75 e 3,5  $\mu\text{M}$ . As concentrações deste nutriente no local Museu variaram de 0 a 3,3  $\mu\text{M}$ . (Figura 4C).

(A)



(B)



(C)

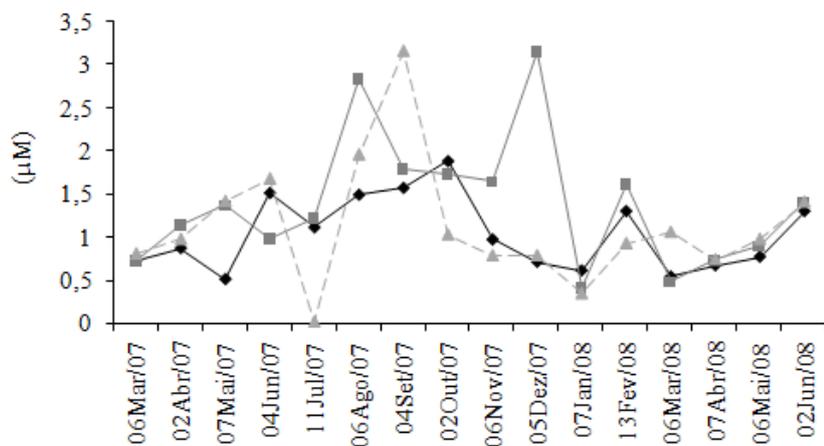


Figura 4. Variações nas concentrações de amônia (A), nitrito+nitrato (B) e fosfato (C) durante o período experimental.

Em todas as estações foram encontrados os seguintes gêneros de fungos filamentosos filios Ascomycota, Basidiomycota, Zigomycota e fungos não esporulados : *Alternaria* , *Aspergillus* , *Aureobasidium* , *Bispora* , *Botryoderma* , *Botryotrichum* , *Cladosporium* , *Chrysosporum* , *Helminthosporium* , *Monosporium* , *Papilospora* , *Penicillium* , *Trichoderma* , *Trichophyton* , leveduras, actinomicetos e fungos não esporulados. Os gêneros mais freqüentes foram *Aspergillus* e *Penicillium* (Tabela 1).



A maior frequência do gênero *Aspergillus* foi no local Museu, em maio de 2007, embora esse organismo tenha sido isolado neste local durante quase todo o período de estudo. Leveduras foram encontradas em 08 amostras neste local de coleta e tiveram a maior frequência em amostras em abril, maio e junho de 2007. Fungos não-esporulados foram encontrados em 07 amostras com valores bastante uniformes. O gênero *Penicillium* foi encontrado em 04 amostras, com maior frequência em Abril de 2007 (Tabela 1).

O maior número de isolados foi encontrado no local Museu (85 isolados). Os locais Barra e Praia tiveram quantidades de isolados similares, 35 e 39, respectivamente (Figuras 5A, 5B e 5C).

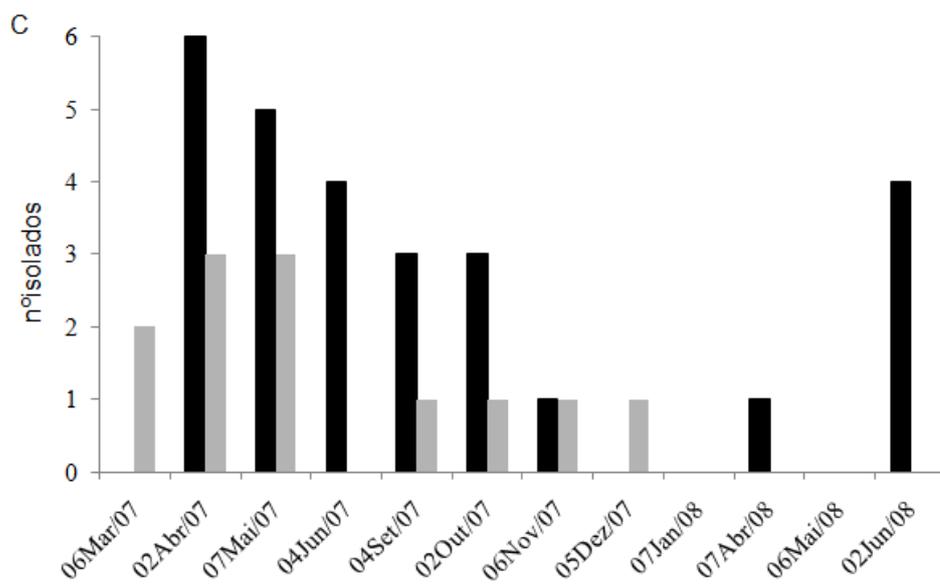
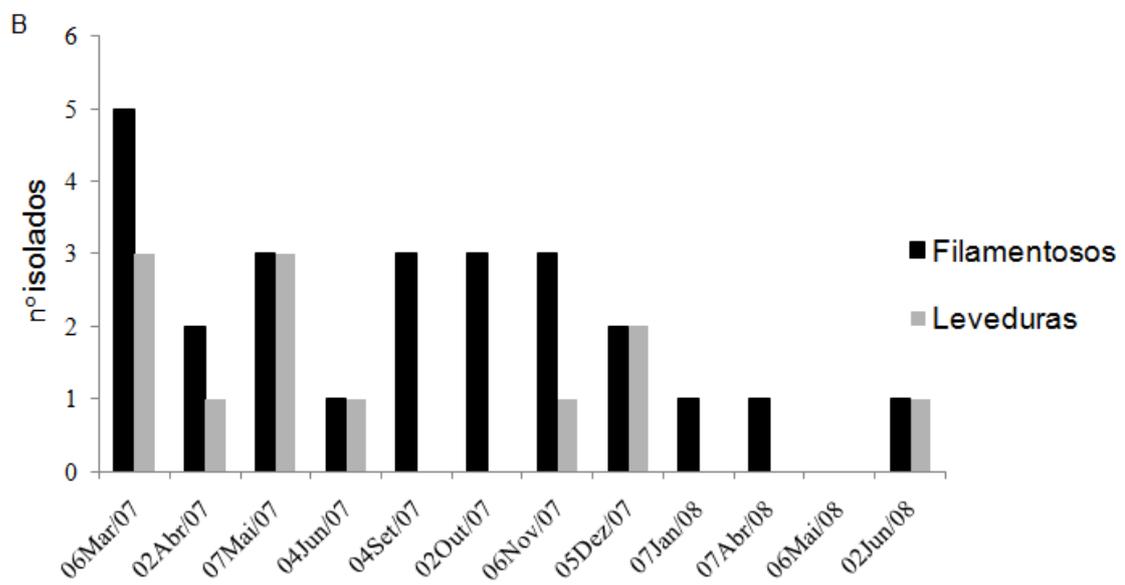
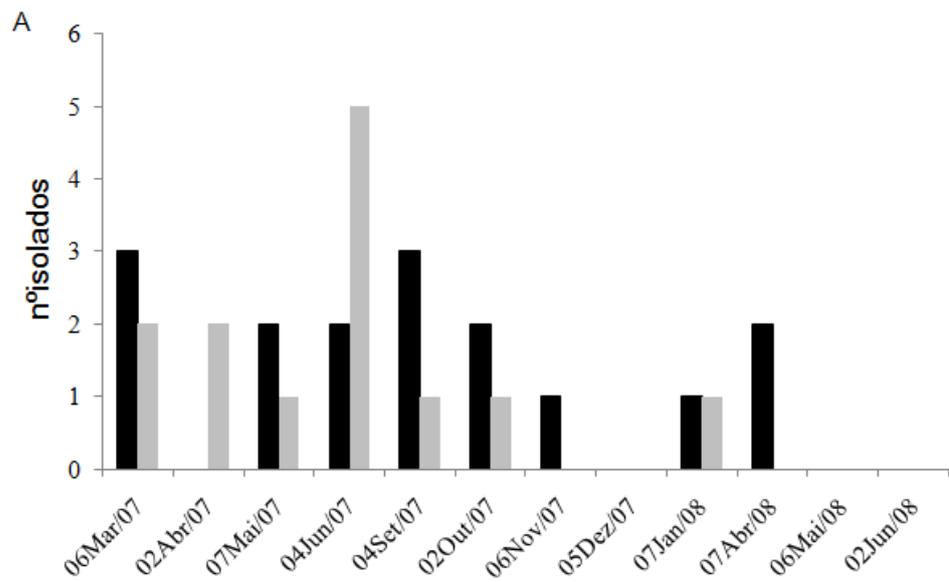


Figura 5. Número de isolados de fungos filamentosos (barras pretas) e leveduras (barras cinzas) na Praia (A), Barra (B) e Museu (C) durante o período experimental.

Neste estudo, alguns gêneros de fungos foram característicos de um único ponto de amostragem. Por exemplo, os isolados de *Botryotrichum*, *Cladosporium*, *Papulospora*, e *Crysosporium*, só foram encontradas na estação de amostragem Praia. O Museu foi o único local de onde *Trichoderma*, *Helminthosporium*, *Trichophyton* e *Botryoderma*, foram isolados, enquanto que o local Barra foi o único local de amostragem com isolados de *Mucor* (Tabela 1).

Entre os grupos isolados de fungos, as leveduras foram encontradas em 07 das 11 amostras no local Barra. A maior ocorrência foi verificada em amostras de março e maio de 2007, embora mostrasse distribuição bastante uniforme durante todo o período experimental. Nesta mesma estação, grupos de fungos não-esporulados foram encontrados em 07 amostras, mostrando elevada ocorrência em maio, outubro e dezembro de 2007 e junho de 2008. *Aspergillus* foi encontrado em 04 amostras, sendo mais frequente em março de 2007.

As leveduras estão entre os principais grupos isolados de fungos no local Praia. Elas foram encontradas em seis de nove amostras, com a maior abundância verificada em junho de 2007 (Figura 5A). Neste local, fungos não-esporulados foram encontrados nas amostras de maio a novembro, mostrando

a ocorrência mais elevada na amostra de setembro de 2007. *Aspergillus* foi encontrado em três amostras, mostrando a maior ocorrência no mês de outubro de 2007.

A análise de regressão múltipla mostrou que existe uma associação significativa entre o número de isolados de leveduras ( $R^2 = 0,40$ ) e salinidade ( $p = 0,01$ ) e pH ( $p = 0,040199$ ). Além disso, foram encontradas correlações significativas ( $R^2 = 0,37$ ) entre o número de gêneros de fungos e fosfato ( $p = 0,005$ ), nitrato ( $p = 0,02$ ) e pH ( $p = 0,024$ ).

## **DISCUSSÃO**

De maneira geral, a comunidade de fungos encontrados na água e região costeira adjacente é composta, predominantemente, de fungos zoospóricos e hifomicetos aquáticos, normalmente encontrados em substratos submersos. Além destes foram encontrados também alguns representantes de basidiomicetos (geralmente fases de reprodução sexuada), ascomicetos (incluindo fases de reprodução sexuada) e quantidades variadas de fungos de origem terrestre e leveduras (Sparrow 1968, Dick 1970).

Shearer *et al.* (2007) analisaram a diversidade de espécies de fungos baseados em dados de presença/ausência de relatos da literatura, e verificaram que os grupos taxonômicos mais freqüentemente encontrados em substratos submersos em habitats aquáticos são: Ascomicetos, Basidiomicetos, Quitridiomicetos e zoospóricos uniflagelados. Em termos de diversidade, a micota aquática pode apresentar porcentagens variadas de fungos de origem terrestre e leveduras e, em águas poluídas, a incidência destes últimos pode ser elevada (Schoenlein-Crusius *et al.* 2004).

Os gêneros *Aspergillus sp* e *Penicillium* , que predominaram em nosso estudo, também foram dominantes no estudo de diversidade fúngica realizado por Gomes *et al.* (2008), com amostras de água da Praia da Casa Caiada (PE, Brasil), onde 50 espécies foram isoladas. Destas amostras, *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais freqüentes, com um total de 11 e 19 espécies, respectivamente, isoladas de amostras de água com alta salinidade e pH alcalino.

As maiores quantidades de isolados de fungos em nosso estudo ocorreram nos meses de abril, maio e junho de 2007, resultado este que, entretanto, não se repetiu no mesmo período em 2008. Analisando os fatores abióticos destes dois períodos, observou-se que a salinidade e pH apresentaram maiores valores em 2008 (figura 2B e 2C), enquanto que as concentrações de amônia (Figura 3A) foram maiores nos meses de 2007 .

Mueller *et al.* (2004) relatam que a salinidade é um fator limitante ao crescimento dos fungos, especialmente aqueles provenientes de ambientes límnicos. Desta forma, o menor número de isolados obtidos em 2008 pode estar relacionado com a salinidade mais alta na região estuarina e costeira. Outro fato que corrobora o efeito da salinidade em nosso estudo foi o gradiente espacial observado cm maior número de isolados na estação Museu (localização mais interna do estuário), onde a salinidade era normalmente mais baixa do que nos outros dois pontos de coleta.

Quanto ao pH, o valor ótimo para o crescimento de diferentes tipos de fungos varimuito, mas a maioria cresce melhor em pH de 4 a 7 (Alexoupoulos *et al.*1996). Note-se que neste estudo, a maior quantidade de fungos ocorreu em amostras de água com valores de pH variando entre 7 e 7,5.

Foi observada neste estudo uma maior diversidade fúngica quando havia maior quantidade de partículas presentes na água, evidenciada pela menor transparência medida pelo Disco de Secchi. Segundo Tang *et al.*(2006) e Jobard *et al.*(2010), em ambiente aquático estes detritos são fontes de recursos para o desenvolvimento de fungos, levando a uma considerável diversidade destes organismos. No estuário da Lagoa dos Patos, o material particulado em suspensão pode ter origem na decomposição das macrófitas *Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora* e *Scirpus maritimus*, que são dominantes neste ambiente (Costa, 1998, Peixoto & Costa, 2004, Cunha *et al.* 2005).

Também a presença de um número maior de isolados de gêneros de fungos relacionado a valores mais altos de amônia (abril, maio e junho 2007), pode ser explicada pelo fato de que, além do carbono, os fungos necessitam de nitrogênio para seu crescimento. Para obter nitrogênio os fungos utilizam fontes orgânicas ou inorgânicas. As principais fontes orgânicas são as proteínas, peptídios e aminoácidos de organismos mortos. Na natureza, os fungos decompõem proteínas, e outras matérias para obter seu suprimento de nitrogênio. Muitos fungos, entretanto, obtêm o nitrogênio a partir de fontes inorgânicas, como nitrato e amônia (Caddick *et al.*1994, Marzluf, 1997). Desta forma, a presença de maior quantidade de isolados neste período poderia estar diretamente relacionada a uma maior absorção de amônia por estes microrganismos. Por outro lado, sabe-se também que a amônia é resultante da decomposição de proteína por bactérias e fungos. Sendo assim, a relação direta entre amônia e o maior número de isolados pode também ter sido resultado da maior decomposição substratos orgânicos pelos fungos.

Quando testamos a associação entre o número de gêneros e fatores abióticos em todos os pontos de coleta, encontramos ainda uma relação positiva entre a concentração de fosfato, e a quantidade de isolados nas três estações de coleta (Praia, Barra e Museu). Vários estudos têm mostrado que um aumento da concentração de nutrientes na água leva a um aumento da diversidade fúngica (Sridhar & Bärlocher 2000, Gulis & Suberkropp 2003 a, b, Gulis & Suberkropp 2004, Pascoal & Cássio 2004). Com relação ao fosfato, especificamente, estudos prévios indicam que o aumento da concentração deste elemento leva a uma maior atividade de decomposição de substratos (Sridhar & Bärlocher 2000; Gulis & Suberkropp, 2003a). Por outro lado, Rosemond *et al.* (2002) não encontraram qualquer efeito do fosfato na decomposição pelos fungos de folhas na água. E Fernandes *et al.* (2009), em um estudo para melhor entender o impacto de múltiplos fatores estressantes sobre os fungos de água doce, observaram que a maior exposição ao fosfato levou a um aumento significativo da biomassa de fungos e a um aumento da produção de esporos em folhas em decomposição.

Em nosso estudo observou-se a ocorrência de gêneros típicos nos diferentes locais de coleta. Por exemplo, a estação Praia foi o único local onde foram encontrados *Botryotrichum* *Cladosporium* sp *Papulospora* sp e *Cryosporium* sp). Museu foi o único local onde *Trichoderma* *Helminthosporium* *Trichophyton* sp e *Botryoderma* sp foram observados. Da mesma forma, *Mucor* só foi encontrado na Barra. Estas ocorrências localizadas poderiam ser explicadas pela influência de alguns fatores, como a salinidade, temperatura, disponibilidade e diversidade de substratos, e nutrientes na água

que poderiam favorecer a ocorrência de algumas espécies (Jones & Alias, 1997).

Por exemplo, *Trichoderma* foi encontrado somente na estação de coleta Museu onde a salinidade foi mais baixa que as outras estações. Rezagui & Lahlou (2005), verificaram em testes *in vitro* com *Trichoderma harzianum* que, para este fungo, o aumento da salinidade no solo pode ser um fator ambiental que limita sua capacidade reprodutiva, pela diminuição da esporulação. *Papulospora*, que só ocorreu na Praia, e que está associado principalmente a processos de decomposição de plantas, foi também identificado em um levantamento para identificação de fungos marinhos na Tailândia ( Gareth *et al.* 2006). Este fungo foi isolado de troncos de madeira em decomposição na zona entre-marés das praias de Laem Son Park. Segundo Wurzbacher *et al.* (2010) fungos aquáticos e filamentosos terrestres necessitam geralmente de um substrato sólido e usam a coluna de água apenas para a dispersão do seus propágulos.

As leveduras são conhecidas por ser um componente normal da biota dos oceanos (Kriss *et al.*, 1967, Fell, 1967). Da mesma forma, a ocorrência de leveduras em águas marinhas costeiras tem sido bem estabelecida (Meyers & Ahearn, 1974; Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979), em função do seu papel na decomposição de substratos orgânicos, reciclagem de nutrientes e biodegradação de hidrocarbonetos (Meyers & Ahearn, 1974, Lachance *et al.* 1976). Em ambientes costeiros, tem sido observado um decréscimo da quantidade de leveduras com o aumento da distância da terra e, certas espécies coletadas frequentemente da água do mar, foram obtidas de áreas bastante poluídas (Fell, 1963).

A presença de leveduras em água do mar no Brasil foi relatada por Faraco & Faraco (1960), em Florianópolis (SC) e por Queiroz *et al.* (1972), que analisaram quanti- e qualitativamente, leveduras isoladas de algas marinhas, em Recife (PE). Em 2005, Loureiro *et al.* analisando a água de praias de Olinda, no estado de Pernambuco isolaram gêneros de leveduras si em águas com salinidade variando de 20 a 40%.

Uma hipótese a ser considerada é que as leveduras isoladas em nosso estudo possam ser terrestres com características halofílica ou halotolerante. Porém, em sua revisão, Sreevedi & Rosamma (2008) citam que a tolerância a salinidade não distingue espécies de leveduras marinhas de espécies terrestres, porque quase todas leveduras podem crescer em concentrações de cloreto de sódio superiores aquelas presentes na água do mar .

Em resumo, os resultados deste estudo mostraram haver uma razoável diversidade de fungos nas águas estuarina e costeira próxima ao estuário da Lagoa dos Patos existindo, entretanto, uma variação espacial, co ocorrência de determinados gêneros restritos ao estuário ou praia. Outros estudos deverão para comprovar os padrões observados de gêneros característicos por local e identificar as espécies de fungos e leveduras no estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente.

## **REFERÊNCIAS**

ABREU, PC, BIDANDA, BB, ODEBRECHT, C. 1992. Bacterial dynamics of the

- Patos Lagoon estuary, Southern Brazil (32° S, 52° W): Relationship with phytoplankton and suspended material. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 35, (6), 621-635.
- ALEXOPOULOS, C. J, MIMS, CW, BLACKWELL, M. 1996. Introductory Micology. 4<sup>th</sup>. ed. John Wiley & Sons, New York. 869p.
- BARNET, HL, HUNTER, BB. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. APS Press. St. Paul, Minnesota. 218p.
- BREPOHL, DC, ABREU, PC, ANÉSIO, AMB, COSTA, CSB. 1996. Variação da biomassa microbiana durante a degradação da macrófita *Scirpus maritimus* var. *macrostachyus* (Lam) Michx. Rio Grande, *Revista Atlântica.*, 18: 13-26.
- BUSTA, FF, PETERSON, EH, ADAMS, DM, JOHNSON, MG. 1984. Clony count method. In: Speck, ML., (ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington D.C. Washington D.C, American Public Health Association., 62-77.
- CADDICK, MX, PETERS, D, PLATT, A. 1994. Nitrogen regulation in fungi. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 64: 169-177.
- COSTA, CSB. 1998. Production ecology of *Scirpus maritimus* in southern Brazil. *Ciência e Cultura Journal of Brazilian Association for the Advancement of Science.*, 50 (4).
- CUNHA, SR, ASMUS, M, COSTA, CSB. 2005. Production Dynamics of *Spartina alterniflora* salt marshes The estuary of Patos Lagoon (RS, Brazil): A simulation model approach. *Braz. J. Aquat. Sci. Technol.*, 9(2):75-85.

- DICK, MW. 1970. Saprolegniaceae on insect exuviae. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55 (3): 449-458.
- FARACO, BFC, FARACO, BA. 1960. Poluição hídrica micológica. *Rev. Bras. Med.*, 33: 210-220.
- FELL, JW. 1967. Distribution of yeasts in the Indian Ocean. *Bull. Mar. Sci.*, 17: 454-470.
- FELL, JW, VAN UDEN, N. 1963. Yeasts in marine environments. In: Oppenheimer, C. H. (ed.). *Symposium on Marine Microbiology*. Charles C. Thomas, Springfield, 329-340.
- FERNANDES, I, DUARTE, S, CASSIO F, PASCOAL, C. 2009. Mixtures of zinc and phosphate affect leaf litter decomposition by aquatic fungi in streams. *Sci. Total Environment.*, 407: 4283-4288.
- GARETH, JEB, PILANTANAPK, A, CHATMALAI, I, SAKAYAROJ,J, PHONGPAICHIT, S, CHOYKLIN, R. 2006. Thai marine fungal diversity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 28 (4): 687-708.
- GOMES, DNF, CAVALCANTI, M.AQ, FERNANDES, MJS, LIMA, DMM, PASSAVANTE, JZO. 2008. Filamentous fungi isolated from sand and water of "Bairro Novo" and "Casa Caiada" beaches , Olinda, Pernambuco. *Brazil. Braz. J. Biol.*, 68 (3): 577-582.
- GULLIS, V, SUBERKROPP, K. 2004. Effects of whole-stream nutrient enrichment on the concentration and abundance of aquatic hyphomycete conidia in transport. *Mycologia.*, 49: 1437-47.
- GULLIS, V, SUBERKROPP, K. 2003a. Effect inorganic nutrients on relative contributions of fungi and bacteria to carbon flow from submerged decomposing leaf litter. *Microb. Ecol.*, 45,11-9.

- GULLIS, V, SUBERKROPP, K. 2003b. Leaf litter decomposition and microbial activity in nutrient-enriched and unaltered reaches of headwater stream. *Freshw. Biol.*, 48: 123-34.
- HAMMER, O, HARPER, DA. T, RYAN, PD. 2001. Palaentological statistics software for education and data analysis. Palaentologia Electronica; Valencia.
- HICKENBICK, GR, FERRO, AL, ABREU, PC. 2004. Produção de detritos de macrófitas emergentes em uma marisma do estuário da Lagoa dos Patos: taxas de decomposição e dinâmica microbiana. *Atlântica.*, Rio Grande; 26: 61-75.
- JOBARD, M, RASCONI, S, SOLINHAC, L, CAUCHIE, HR, SIME-NGANDO, T. 2012. Molecular and morphological diversity of fungi and the associated functions in three European nearby lakes. *Environ. Microbiol.*, doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02771.x
- JONES, EB. G, ALIAS, A. 1997. Biodiversity of mangrove fungi. In: Hyde, K. D. (ed). Biodiversity of tropical microfungi. Hong Kong University Press, Hong Kong, p. 71–92.
- KOHLMEYER, J, KOHLMEYER, E. 1979. Marine mycology: the higher fungi. Academic Press, New York.
- KRISS, AE, MISHUSTINAI, E, MITSKEVICH, N, ZEMTSOVA, EV. 1967. Microbial Population of Ocean and Seas. Arnold, London.
- LACHANCE, M.A, MIRANDA, M, MILLAR, MW, PHAFF, HJ. 1976. Dehiscence and active spore release in pathogenic strains of the yeast *Metschnikowia bicuspidate* var. *australis*: possible predatory implication. *Can. J. Microbiol.*, 22: 1756–1761.

- LOUREIRO, STA, CAVALCANTI, M.AQ, NEVES, RP, PASSAVANTE, JZO. 2005. Yeasts isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco state, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 36: 333-337.
- MARZLUF, GA. 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Bio.*, 61:17-32.
- MEYERS, AHEARN, DG. 1974. Implication of Yeasts and Yeast- like Fungi in Marine Process. *Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremen.*, Suppl. 5: 321-338.
- MUELLER, GM, BILLS, GF. 2004. Introduction. In: Mueller, GM, Bills, GF, Foster, MS. (eds). Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press, San Diego, p. 1-4.
- PASCOAL, C, CASSIO, F. 2004. Contribution of fungi and bacteria to leaf litter decomposition in a polluted river. *Appl. Environ. Microbiol.*; 70: 5266-73.
- PEIXOTO, AR, COSTA, CSB. 2004. Produção líquida aérea de *Spartina alterniflora* Brong. (Poaceae) no estuário da laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Sér. Bot. Porto Alegre.*, 59 (1): 27-34, jan/jun.
- PUTZKE, J, PUTZKE, MTL. 2002. O reino dos fungos. Volume 2. Editora Edunisc. Santa Cruz do Sul. 829p.
- QUEIROZ, LE. 1972. Análise Quanti - Qualitativa de leveduras isoladas de algasmarinhas. I - Recife, Instituto de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, publ. 677.
- REGRAGUI, A, LAHLOU, H. 2005. Effect of Salinity on *in vitro* *Trichoderma harzianum* Antagonism Against *Verticillium dahlia*. *Pak. J. Biol. Sci.*, 8 (6): 872-876.
- RIDELL, R. W. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained

by slide culture. *Mycologia.*, 42: 265-70.

ROSEMOND, AD, PRINGLE, CM, RAMIREZ, A, PAUL, MJ, MEYER, JL. 2002.

Landscape variation in phosphorus concentration and effects on detritus-based tropical streams. *Limnol. Oceanogr.*, 47: 278-89.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, IH, PIRES-ZOTARELLI, CLA, MILANEZ, AI. 2004.

Amostragem em Limnologia: Os fungos Aquáticos. *In: Bicudo, C. E. M.; Bicudo, D. C. Amostragem em Limnologia. 2. Ed. Rima Editora. São Carlos, p. 179-191.*

SEELIGER, U, ODEBRECHT, C, CASTELO, JP. 1998. Os Ecossistemas

Costeiros e Marinho do Extremos Sul Do Brasil. Rio Grande, RS. Ed. Ecoscientia. 341p.

SHEARER, CA, DESCALS, E, KOHLMAYER, B, KOHLMAYER, J,

MAREVANOVÁ, L, PADGET, D, PORTER, D, RAJÁ, H. A, SCHIMIT, JP, THORTON, HÁ, VOGLYMAYR, H. 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodivers. Conserv.*, 16: 49-67.

SILVA, M, CERNIGLIA, CE, POTHULURI, JV, CANHOS, VP, ESPOSITO, E.

2003. Screening filamentous fungi isolated from estuarine sediments for the ability to oxidize polycyclic aromatic hydrocarbons. *World J Microbiol. Biotechnol.*, 19: 399–405.

SPARROW, FK. 1968. Ecology of freshwater fungi. *In: Gainswoth, GC,*

*Sussman, AS. (eds). The fungi. Academ. Press, New York, p. 41-91.*

SREEDEVI, NK, ROSAMMA, P. 2008. Marine yeasts — a review. *Yeast.*, 25:

465–483.

- SRIDHAR, KR, BÄRLOCHER, F. (2000). Initial colonization, nutrient supply, and fungal activity on leaves decaying in streams. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1114-9.
- STRICKLAND, JD. H, PARSON, TR. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa. 310p.
- VASCONCELOS, WE, RIOS, MS, SOUSA, AH, MEDEIROS, EV, SILVA, GMC, MARACAJÁ, PB. 2003. Caracterização química e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. *Revista de Biologia e Ciências da Terra.*, 3: 2.
- TANG, KW, HUTALLE, KML, GROSSART, HP. 2006. Microbial abundance, composition and enzymatic activity during decomposition of copepod carcasses. *Aquat Microb Ecol*; 45: 219–227.
- UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Intergovernmental Oceanographic Commission. Manual and Guides 12, Paris.
- WURZBACHER, CM, BÄRLOCHER, F, GROSSART, HP. 2010. Fungi in lake ecosystems. *Aquat. Microb. Ecol*; 59: 125–149.
- ZAR, JH. 1996. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, New Jersey.

## CAPITULO II

### VARIAÇÃO ESPACIAL E TEMPORAL DE FUNGOS E LEVEDURAS NO ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS E PRAIA DO CASSINO, RIO GRANDE, RS, BRASIL.

#### RESUMO

Neste estudo foi avaliada a variabilidade espacial e temporal de fungos e leveduras nas águas da região estuarina da Lagoa dos Patos e praia do Cassino. Amostras de água foram coletadas mensalmente pelo período de um ano (junho 2009 – julho 2010) em três pontos distribuídos ao longo do estuário da Lagoa dos Patos e na região costeira adjacente. A presença de fungos e leveduras foi avaliada através da análise morfológica de isolados em ágar Sabouraud e cloranfenicol e, para as leveduras, através do sistema automatizado Vitek II<sup>®</sup>. Foram medidas também a temperatura da água, salinidade, pH, material particulado em suspensão (MPS) e os nutrientes inorgânicos dissolvidos fosfato, amônia e nitrito+nitrato. Os gêneros de fungos identificados durante o estudo foram *Aspergillus*, *Bispora*, *Botryoderma*, *Cladosporium*, *Dictyosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phialophora*, *Speiroopsis*, *Rhizoctonia*, *Scopulariopsis*, *Syncephalastrum*, *Tilletiopsis*, *Trichophyton*, *Verticillium* além das leveduras *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus albidus*, *Issatchenkia orientalis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula minuta* e *Yarrowia lipolytica*. A microalga *Prototheca*, que tem características de fungo, também foi identificada neste estudo. Os três locais

de amostragem apresentaram número similar de gêneros, embora alguns destes tenham ocorrido em apenas um local de amostragem. Foi observado nos locais de amostragem Barra e Museu um aumento no número de gêneros e isolados no mês de agosto de 2009, com posterior queda em setembro de 2009. A partir de outubro até dezembro de 2009 estes valores aumentaram novamente. Estas variações foram relacionadas com o aumento de material em suspensão e da temperatura da água, respectivamente. Em geral, não se observou a influência de outros fatores ambientais sobre a ocorrência dos diferentes gêneros de fungo, com exceção de *Tilletiopsis*, cuja ocorrência parece ser afetada pela salinidade e concentrações de nitrito+nitrato e fosfato. Por outro lado, a presença de Leveduras esteve relacionada com os nutrientes nitrito +nitrato e com o pH.

## **INTRODUÇÃO**

Fungos marinhos formam um grupo ecológico, mas não taxonômico (Hyde *et al.* 2000). Os fungos marinhos obrigatórios são aqueles que crescem e se reproduzem exclusivamente na água do mar. Por outro lado, os fungos marinhos facultativos são provenientes da água doce ou de ambiente terrestre e sofreram adaptações fisiológicas que lhes permitem crescer e reproduzir também no ambiente marinho (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979).

Diferentes grupos de fungos podem ser encontrados na água, incluindo fungos zoospóricos, Zygomycota, fungos Anamórficos, Ascomycota e poucos pertencente a Basidiomycota (Hyde, 1997).

No Brasil são poucos os estudos sobre fungos marinhos, destacando-se os primeiros trabalhos desenvolvidos por Faraco & Faraco (1974), Mattede *et*

*al.* (1986), Purchio *et al.* (1988), Pinto *et al.* (1992) e Sarquis & Oliveira (1996). Os estudos mais recentes sobre os fungos marinhos no Brasil, na sua maioria, foram conduzidos em praias turísticas e tiveram como objetivo a avaliação sanitária destes locais. Por exemplo, Gomes *et al.* (2008), desenvolveram um estudo que teve como objetivo isolar e identificar fungos filamentosos da areia e da água das praias de Casa Caiada e Bairro Novo, principais praias de Olinda, Pernambuco. Neste estudo foram isoladas e identificadas 57 espécies de fungos, correspondentes a 20 gêneros. *Aspergillus* e *Penicillium* dominaram tanto no solo quanto na água, com um total de 11 e 19 espécies, respectivamente. E Loureiro *et al.* (2005), que isolaram e identificaram leveduras nestas mesmas praias, observaram que espécies do gênero *Candida* (*Candida catenulata*, *C. fenica*, *C. sake*, *Brettanomyces bruxelenses*) e *Rhodothorula mucilaginosa* foram as espécies mais comumente encontradas.

Oliveira *et al.* (2011), que estudaram fungos filamentosos de amostras de água e solo da praia de Candeias, Pernambuco, obtiveram 57 espécies correspondentes a 19 gêneros.. *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais abundantes. Estes autores apresentaram dois novos registros de fungos para a América Latina e Nordeste brasileiro, que são *Penicillium diversum* e *Varicosporium elodeae*.

No estuário da Lagoa dos Patos existem, até o presente momento, somente dois estudos publicados sobre a comunidade de fungos aquáticos. Mendoza *et al.* (no prelo), conduziram um estudo para identificar organismos patogênicos na água do porto de Rio Grande, situado no estuário da Lagoa dos Patos. Estes autores evidenciaram a presença de fungos em 88,3% das amostras de água coletadas dentre estes os filamentosos *Aspergillus*,

*Penicillium* , *Cladosporium* , e a levedura *Rhodotorula* Já Hickenbick *et al.* (2004) observaram durante a decomposição de três espécies de macrófitas aquáticas na região estuarina da Lagoa dos Patos uma grande quantidade de esporos de fungos nas amostras analisadas, porém não foram conduzidas identificações destes microrganismos.

Mais recentemente, Silveira & Abreu (submetido – Cap. 1) avaliaram a variabilidade espacial e temporal de fungos nas águas da região estuarina da Lagoa dos Patos e Praia do Cassino, com amostras mensais de água em três estações distribuídas entre o estuário da Lagoa dos Patos e a região costeira adjacente, no período de Junho de 2007 a Junho de 2008. As variáveis ambientais temperatura da água, salinidade, pH e nutrientes inorgânicos dissolvidos (fosfato, amônia, nitrito e nitrato) também foram analisadas. Os autores observaram em seus resultados que *Aspergillus*, *Penicillium* e os agrupamentos fungos não esporulados e leveduras foram os isolados mais freqüentes, e a distribuição dos fungos foi correlacionada, principalmente, com salinidade e concentrações de amônia e fosfato.

O presente estudo visa dar continuidade à avaliação da variabilidade espacial e temporal de fungos no estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente. Além das variáveis analisadas no trabalho anterior, neste estudo foi realizada a identificação das leveduras em nível de espécie pelo sistema automatizado Vitek II (Biomérieux). Com os resultados deste estudo é possível traçar um perfil mais completo da comunidade de fungos no estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente e verificar se existe uma alta variabilidade destes organismos em função de pequenas variações ambientais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Local do estudo***

Foram amostradas 2 (duas) estações de coleta no estuário da Lagoa dos Patos (molhes da Barra e Yacht Clube-Museu de Rio Grande) e 1 (uma) estação na Praia do Cassino (Figura 01). Para este estudo foram realizadas 12 coletas mensais no período de junho de 2009 a junho de 2010. Em cada ponto foram coletadas três amostras de 500 ml de água, sendo utilizados frascos de vidro, esterilizados, com boca larga (5 cm de diâmetro) e tampa hermética, modelo Wheaton. Cada frasco foi submergido rapidamente com a boca para baixo, 30 cm abaixo da superfície. Os locais e as coletas acompanharam o PELD (Programa Ecológico de Longa Duração)

Os dados abióticos como temperatura da água, temperatura do ar (termômetro Incoterm -1°C – 100°C), salinidade ( Hand Refractometer ATAGO S0 MILL/-E salinity 0 ~ 100), pH (Phmetro DIGIMED DMPH-3) e transparência da água (Disco de Secchi) registrados no momento de cada coleta e as análises das concentrações dos nutrientes fosfato, nitrato+nitrito (Strickland & Parsons,1972) e amônia (UNESCO, 1983), foram gentilmente cedidos pelo PELD (Programa Ecológico de Longa Duração).

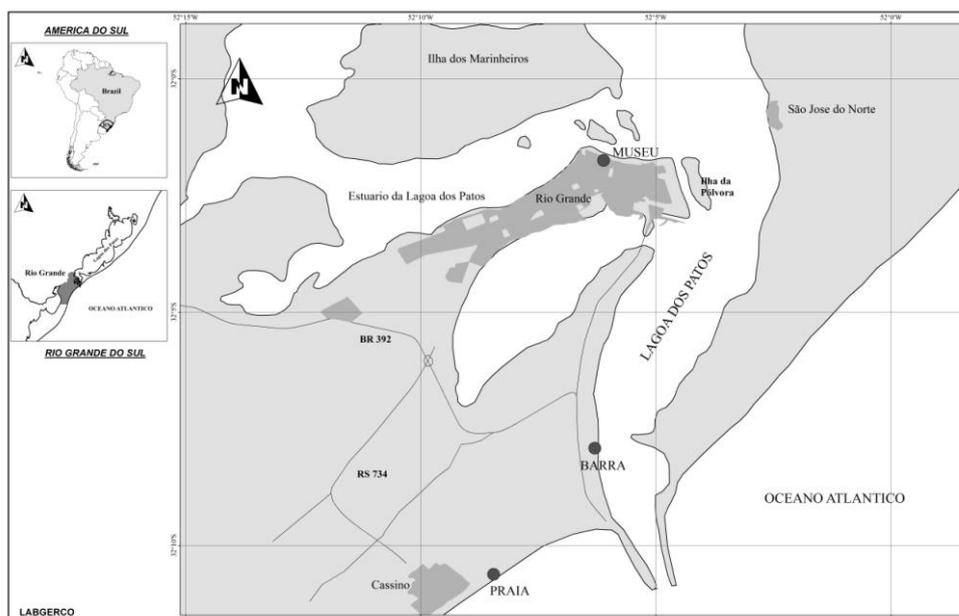


Figura 1. Locais de amostragem: Museu , Barra e Praia.

As amostras para a determinação do material particulado em suspensão (MPS) foram filtradas em filtros pré-pesados GF 52C Schleicher & Schuell, imediatamente após a chegada no laboratório e os filtros armazenados a -20 °C até posterior determinação pelo método gravimétrico descrito em Strickland & Parsons (1972).

Os dados de precipitação pluviométrica foram obtidos Do Banco de Dados Meteorológicos da Universidade Federal do Rio Grande.

### ***Isolamento e identificação de Fungos e Leveduras das amostras***

Após a coleta as amostras foram separadas em alíquotas de 50 ml e centrifugadas a 4500 rpm por 10 minutos, para concentração do material em suspensão. Posteriormente, o material concentrado foi diluído em solução PBS

(Phosphate Buffer Solution) pH 7,2, nas proporções de 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4(Busta *et al.* 1984).

O cultivo dos fungos foi realizado com alíquotas de 0,1 mL de cada uma das diluições que foram espalhadas na superfície de placas contendo meio ágar Sabouraud acrescido de Cloranfenicol (Acumedia) e colocados em estufa bacteriológica a 25°C (Busta *et al.* 1984). Os cultivos foram observados diariamente por até 07 (sete) dias.

A identificação dos fungos filamentosos em nível de gênero, foi baseada nas suas características de macro- e de micromorfologia (Alexopoulos *et al.* 1996, Barnett & Hunter,1998), Putzke & Putzke,2002), sendo que as características micromorfológicas foram observadas utilizando-se a Técnica de Microcultivo (Ridell,1950).

A identificação das leveduras isoladas foi conduzida no Laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas - UFPEL, primeiramente avaliando-se os caracteres morfológicos e posteriormente, realizando-se testes de assimilação e fermentação de diferentes fontes de Carbono e Nitrogênio através do sistema automatizado Vitek II (Biomérieux), que é de um equipamento para a identificação microbiana baseado na formação de cor por mudança de pH a partir da absorção/fermentação de um substrato específico, de acordo com o metabolismo característico de cada espécie. Os resultados dos testes fenotípicos, associados aos dados de assimilação e fermentação dos isolados obtidos a partir do sistema Vitek II foram compilados e analisados junto ao sistema Poliphasic Identification do MycoBank da International Mycological Association (IMS). Para este estudo, consideramos um grau de similaridade

dos resultados com o banco de dados do sistema, superior a 95%, nível de distância dos dados obtidos com aqueles presentes no sistema de identificação igual a zero e o maior número de caracteres similares.

### ***Análise Estatística***

As análises estatísticas foram feitas com os isolados identificados com frequência acima de 40%. Para avaliar a correlação de ocorrência dos gêneros identificados com os fatores abióticos foi utilizado o modelo de Regressão Múltipla Logística com dados de presença e ausência, utilizando a função glm do Programa R Development Core Team (2012), com família binomial e função de ligação logit. As variáveis incluídas no modelo foram temperatura da água, salinidade, pH, nutrientes inorgânicos dissolvidos (fosfato, amônia, nitrito+ nitrato), material particulado em suspensão (MPS) e local como fator com três níveis (Praia, Barra e Museu). Além disso, foi também usado o modelo de Regressão Binomial Negativa, com função de ligação log para verificar a relação da abundância dos gêneros com as variáveis abióticas e locais de amostragem (McCullagh & Nelder, 1997). Para todas as análises estatísticas foi usado o Programa R Development Core Team (2012).

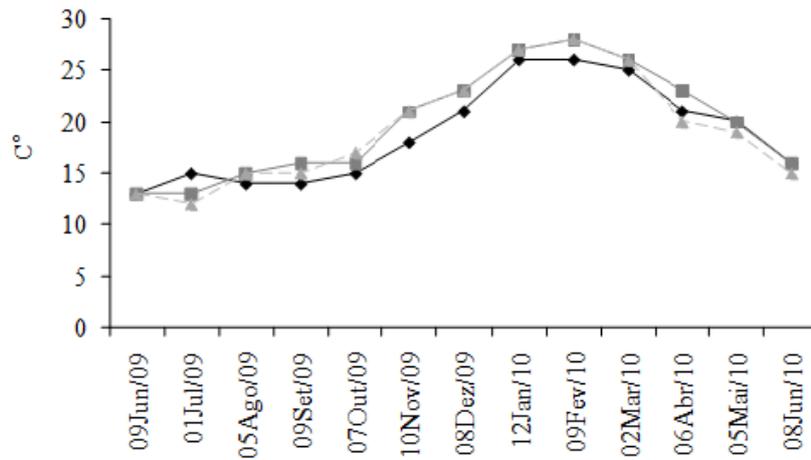
## **RESULTADOS**

A temperatura da água foi semelhante nas três estações e mostrou um padrão sazonal, com menor valor (12 °C) em julho de 2009 e o mais alto (28 °C) em fevereiro de 2010 (Figura 2A).

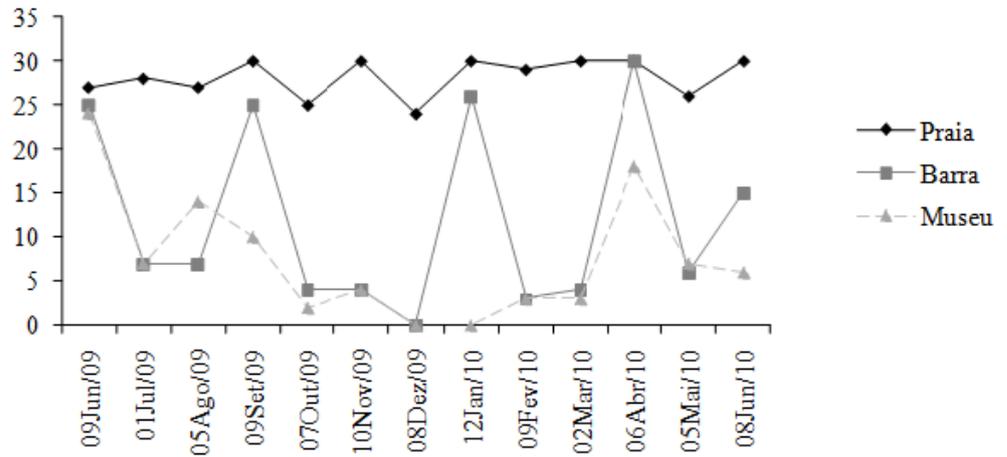
A salinidade variou de acordo com o local local de amostragem. No local Praia, a salinidade variou de 25 a 30. Os locais Barra e o Museu apresentaram maior variabilidade, com valores maiores (30 e 24) observados em abril de 2010 e junho de 2009 e valor mínimo (0) em dezembro de 2009 e janeiro de 2010 (Figura 2B).

Os níveis de pH mantiveram-se estáveis ao longo do estudo nas três estações, com valores variando entre 7,6 e 8,5 (Figura 2C).

(A)



(B)



(C)

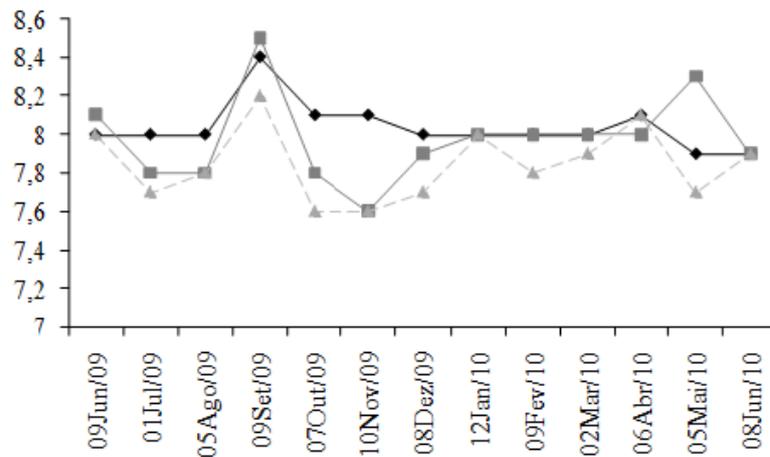


Figura 02. Variação da temperatura da água (A), salinidade (B) e pH (C) durante o período experimental.

A precipitação pluviométrica durante o período experimental foi mais baixa em julho de 2009 (44,1 mm) e março de 2010 (42,6mm). O valor mais elevado foi observado em fevereiro de 2010 (277,2 mm) (Figura 3A).

O material particulado em suspensão (MPS) apresentou seu maior valor no local Praia em setembro de 2009 (1155 mg/L). O menor valor foi observado no local Museu em dezembro de 2009 (20mg/L) (Figura 3B).

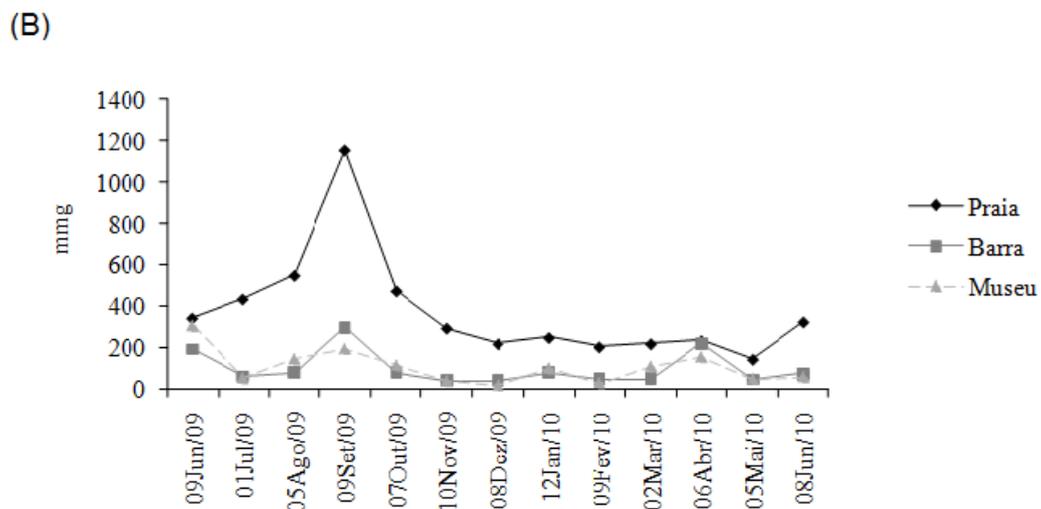
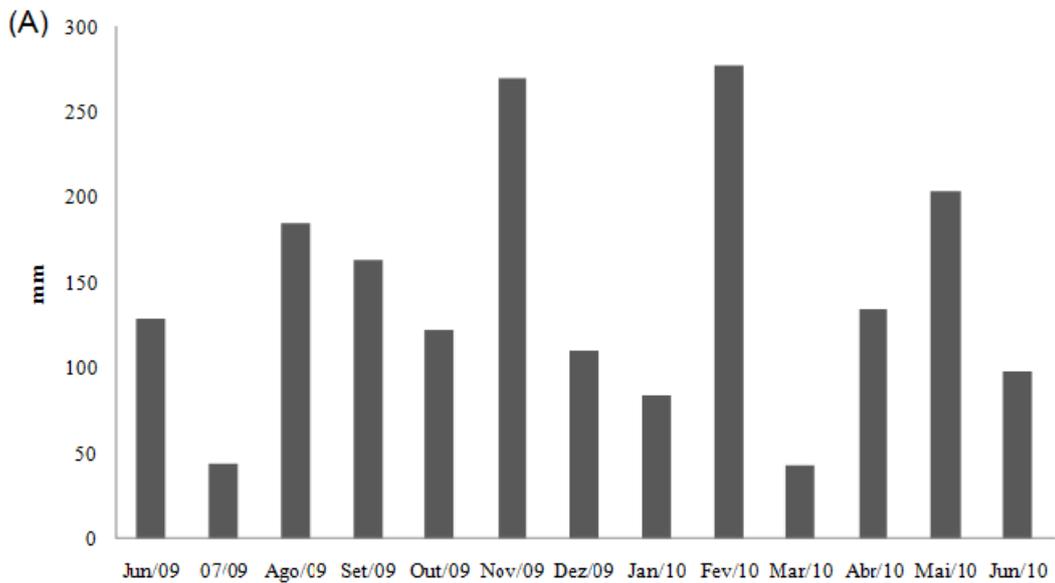


Figura 03. Variação dos valores de precipitação pluviométrica (A) e material particulado em suspensão (MPS) (B) durante o período experimental.

Os menores valores de amônia ocorreram no local Praia. Todos os locais (Praia, Barra e Museu) apresentaram seu menor valor em junho de 2009, com 0,06, 0,99 e 3,37  $\mu\text{M}$ , respectivamente. E os maiores valores foram observados na Barra em fevereiro de 2010 (81,87  $\mu\text{M}$ ) e Museu, em dezembro de 2009 (81,51  $\mu\text{M}$ ) (Figura 4A).

Os valores de Nitrito+Nitrato foram baixos no local Praia, apresentando maior valor (8,58  $\mu\text{M}$ ), em junho de 2010. O local de amostragem Barra apresentou o maior valor deste nutriente em janeiro de 2010 (33,57  $\mu\text{M}$ ) (Figura 5B). O local Museu apresentou valores altos de Nitrito+Nitrato nos meses de outubro, novembro de 2009 e junho de 2010, sendo a última citada de maior valor de todas as amostras (17,01  $\mu\text{M}$ ) (Figura 4B).

Valores de fosfato das amostras apresentaram padrões distintos em cada local de coleta. No local Praia os valores variaram entre 0,33 e 1,43  $\mu\text{M}$ , sendo o valor máximo observado em março de 2010. O local Barra também mostrou grandes variações, com valores entre 0,28  $\mu\text{M}$  em setembro de 2009 a 2,73  $\mu\text{M}$  em janeiro de 2010. No local Museu foram verificadas as maiores variações durante o período de amostragem, variando de 0,33  $\mu\text{M}$  em julho e agosto de 2009 a 2,67  $\mu\text{M}$  em fevereiro de 2010 (Figura 4C).

Figura4. Variações nas de concentração de amônia (A), nitrito+nitrato (B) e fosfato (C), durante o período experimental.

Quanto ao número de gêneros de fungos, os três locais tiveram quantidades similares de isolados, com 13, 11 e 14 nos locais Praia, Barra e Museu, respectivamente (Figura 5 A, B e C). Nos locais de amostragem Barra e Museu um aumento no número de gêneros e isolados a partir de outubro até dezembro de 2009.

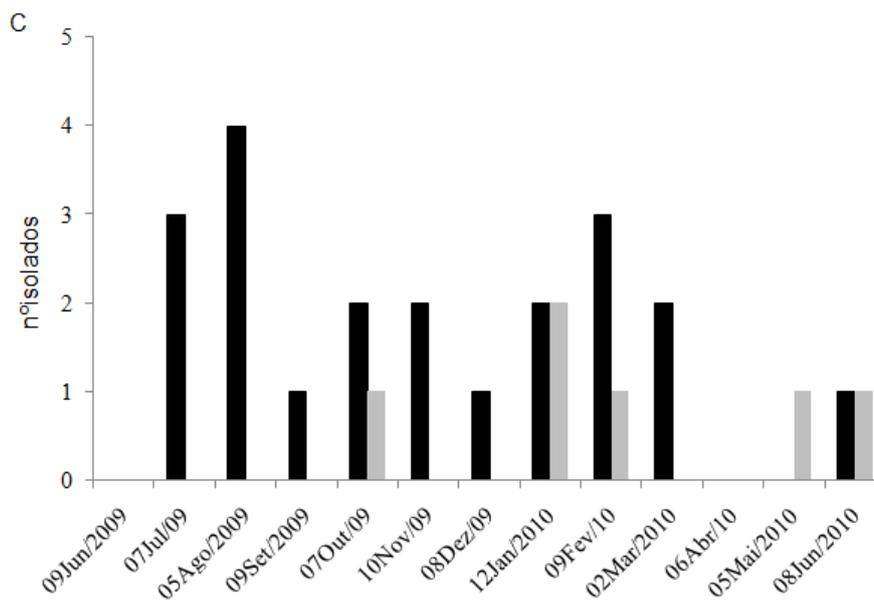
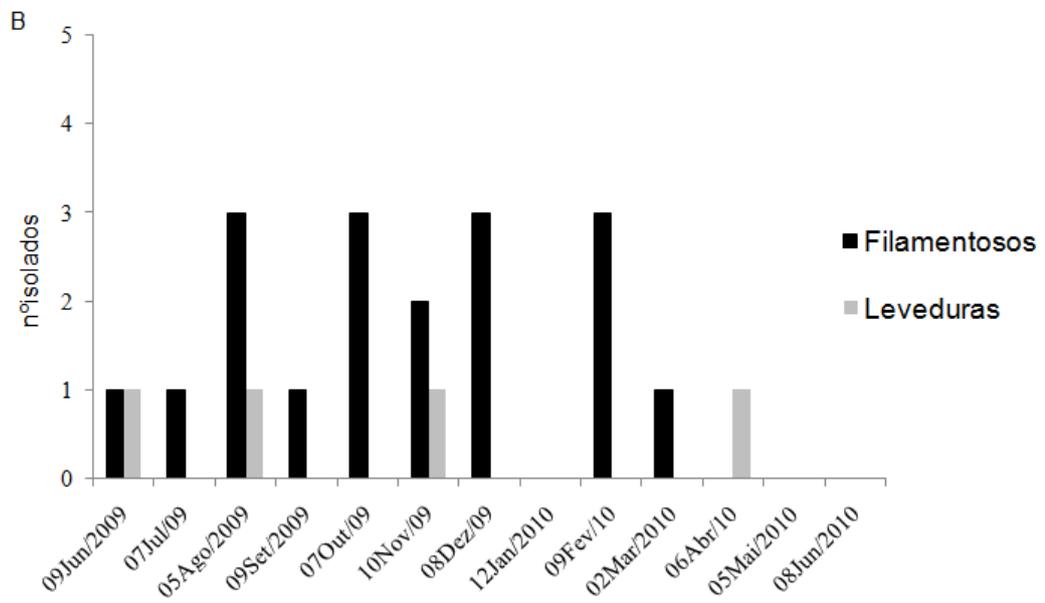
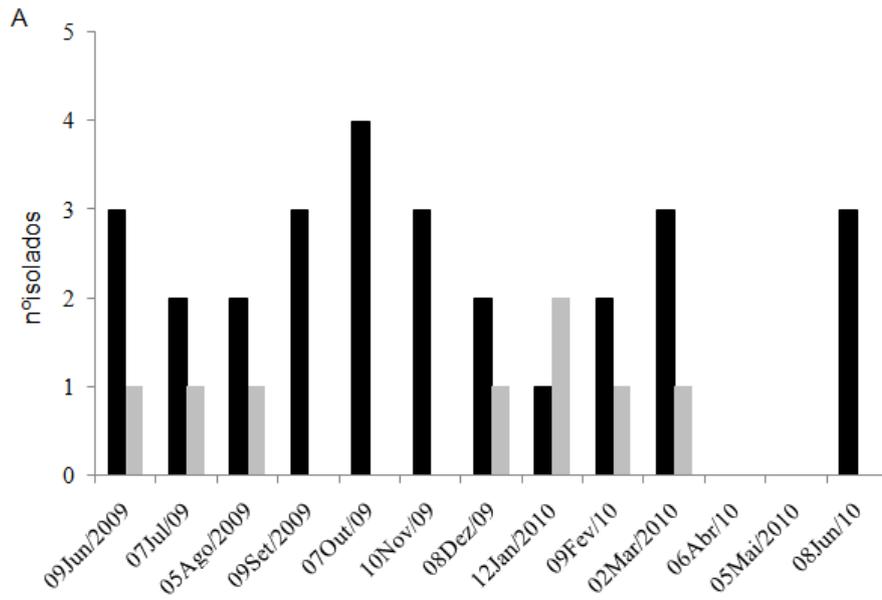


Figura 5. Número de isolados de fungos filamentosos (barras pretas) e leveduras (barras cinzas) na Praia (A), Barra (B) e Museu (C), durante o período experimental

A maioria dos isolados deste estudo pertencem ao filo Ascomycota. Foram encontrados os seguintes gêneros de fungos filamentosos e leveduras: *Aspergillus* , *Bispora* , *Botryoderma* , *Cladosporium* , *Dictyosporium* , *Paecilomyces* , *Penicillium* , *Phialophora* , *Prototheca* , *Speiroopsis* , *Rhizoctonia* , *Scopulariopsis* , *Syncephalastrum* , *Tilletiopsis* , *Trichophyton* , *Verticillium* e as leveduras *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus albidus*, *Issatchenkia orientalis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula minuta* e *Yarrowia lipolytica* (Tabela1).

Tabela 1. Gêneros de fungos isolados nos diferentes locais (Praia, Barra e Museu) e períodos de amostragem (junho de 2009 – junho de 2010).

Local	Meses	Filamentosos											Leveduras					Microalga Clorophyta						
		Ascomycota											Basidiomycota	Zygomycota	Ascomycota					Basidiomycota				
		<i>Aspergillus</i>	<i>Bispora</i> sp	<i>Botryderma</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Dycitosporium</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Phialophora</i>	<i>Scopulariopsis</i>	<i>Speirsoipsis</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichophyton</i>	<i>Trichotecium</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Tilletopsis</i>	<i>Syncephalastrum</i>		<i>Candida parapsifosis</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Rhodothorula minuta</i>	<i>Rhodothorula mucilaginoso</i>
Praia	Jun					x			x	x													x	
	Jul						x							x				x				x		
	Ago	x						x													x			
	Set	x								x				x										
	Out	x		x				x						x										
	Nov	x					x								x									
	Dez	x					x																	x
	Jan														x				x					x
	Fev														x	x	x							
	Mar			x	x										x			x						
	Abr																							
	Mai																							
Jun			x				x																	
Barra	Jun											x												x
	Jul													x										
	Ago				x			x	x										x					
	Set		x																					
	Out	x			x									x										
	Nov					x								x										x
	Dez						x						x	x	x									
	Jan																							
	Fev	x													x									
	Mar														x									
	Abr																	x						
	Mai																							
Jun																								
Museu	Jun																							
	Jul	x												x										
	Ago		x		x			x						x										
	Set						x																	
	Out		x											x										
	Nov		x																					x
	Dez													x										
	Jan													x					x					x
	Fev							x							x			x						
	Mar														x									
	Abr								x															
	Mai																							
Jun							x				x								x					

Entretanto, alguns gêneros de fungos foram característicos de um único local de amostragem. Por exemplo, os gêneros *Paecilomyces*

*Syncephalastrum* sp e *Botryoderma* foram encontrados somente no local Praia. O local de amostragem Barra foi o único em que *Dictyosporium* sp foi isolado, enquanto que o local Museu foi a único local com isolados de *Prototheca*, *Rhizoctonia* e *Scopulariopsis*

As maiores freqüências de ocorrência por local de *Tilletiopsis* e leveduras, foram observadas nas amostras do local Praia, quando esteve presente em 07 amostras (julho, setembro, outubro e novembro de 2009 e janeiro e março de 2010 apresentando maior abundância em novembro de 2009). Leveduras estiveram presentes no local Praia em 07 amostras (junho, julho, agosto e dezembro de 2009 e janeiro, fevereiro e março de 2010). Sua maior abundância foi observada na amostra de dezembro de 2009 (Tabela1).

A análise estatística mostrou que a presença de *Tilletiopsis* esteve positivamente relacionada com nitrito+nitrato ( $p=0,02$ ), e negativamente com fosfato ( $p=0,01$ ) e salinidade ( $p=0,005$ ). Houve diferenças na distribuição deste gênero entre o local Praia ( $p=0,04$ ), Barra ( $p=0,03$ ), sendo ambas diferentes do Museu ( $p=0,06$ ). A presença de Leveduras, por sua vez, esteve relacionada negativamente com nitrito +nitrato ( $p=0,02$ ) e pH ( $p=0,03$ ).

## **DISCUSSÃO**

Os fungos isolados neste estudo são, na sua maioria, pertencentes ao filo Ascomycota, com exceção de *Rhizoctonia*, *Tilletiopsis*, que são Basidiomycota; *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula minuta* e *Cryptococcus albidus*, que são leveduras basidiomicéticas e *Syncephalastrum*, que é um Zigomycota.

O predomínio de fungos Ascomycota encontrado neste estudo está de acordo com as observações de Shearer *et al.* (2007) que, baseados na presença e ausência de espécies, concluíram que Ascomycota é grupo taxonômico de fungos predominante em ambientes aquáticos. Estes mesmos autores também relataram que em grande parte dos trabalhos, zigomicetos são ausentes e que basidiomicetos aparecem raramente em ambientes aquáticos. A exceção é para as leveduras basidiomicéticas que podem dominar comunidades micoplanctônicas (Jones, 2009).

Apesar dos locais Praia, Barra e Museu apresentarem número similar de gêneros, alguns destes foram característicos do local de amostragem. Por exemplo, o local Praia foi local onde foram isolados os gêneros *Paecilomyces*, *Syncephalastrum* sp e *Botryoderma*. O gênero *Paecilomyces* sp já foi relatado como fungo marinho por Richards *et al.* (2012), que exploraram a diversidade de fungos marinhos e sua filogenia. Estes autores citaram a ocorrência de *Paecilomyces hepiali* e *Paecilomyces fumosoroseus* em seus resultados.

Burgaud *et al.* (2009) conduziram um estudo sobre a diversidade de fungos filamentosos marinhos cultiváveis de fontes hidrotermais em oceano profundo, na tentativa de compreender sua diversidade, abundância e função destes organismos neste ambiente, encontraram *Paecilomyces lilacinus*.

No Brasil, no estado de Pernambuco, Oliveira *et al.* (2011), com o propósito de isolar e identificar fungos filamentosos da Praia de Candeias, a partir de amostras de água e solo deste local, obtiveram *Syncephalastrum* das amostras de água.. Este gênero também fora relatado por Pinto *et al.* (1992) na Praia de Boa Viagem, neste mesmo estado.

O gênero *Botryoderma* , isolado no local Praia, não tem sido relatado em estudos realizados em ambientes marinhos, porém também fora encontrado em areia de ambientes de regiões costeiras de Porto Rico (Hernández-Vera, 1982, Hernández-Vera & Almodóvar, 1983, 1984).

*Dictyosporium* isolado somente no local Barra, foi citado por Shearer *et al.* (2007), que o classificaram como gênero migrante, uma vez que este ocorre com frequência em habitats de água doce. *Dictyosporium* sp também já foi isolado de madeiras submersas em Tai Ho Bay, Hong Kong por Tsui *et al.* (2004), em um local de coleta no estuário influenciado pela inundação das marés, similar ao local de coleta neste estudo.

O local Museu foi o único de onde foram isolados os gêneros *Rhizoctonia* , e *Scopulariopsis* , e também a microalga *Prototheca Rhizoctonia* , foi citada como presente em ambientes aquáticos em um levantamento feito por Domsch *et al.* (1980), que relataram que *Rhizoctonia solani* é encontrada em pântanos e mangues.

Larashati *et al.* (2008), com o objetivo de estudar a abundância e diversidade de fungos que habitam o sedimento do estuário Muara Layang, Bangka Belitung Islands, obtiveram isolados de *Scopulariopsis* , e também Nieves-Rivera (2005) obteve isolados deste gênero no estuário Laguna Rincón, Porto Rico. E Mbata *et al.* (2008) isolaram e caracterizaram fungos filamentosos de amostras de água de Yardenit-Baptismal no Jordan River, onde este rio flui para o Mar Morto, obtendo *Scopulariopsis* , em 2,4% de um total de 126 amostras.

A microalga *Prototheca* é um organismo similar a leveduras (leveduriforme – “yeast-like organisms”) e, por isto, é estudada pela micologia.

Este microrganismo esteve presente em amostras isoladas do local Museu. Este gênero tem distribuição cosmopolita e é facilmente isolado das mais diversas coleções de água, sendo descritas no Brasil nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Meireles & Nascente, 2009). *Prototheca* tem sido descrita por sua importância como patógeno para homens e animais. Em bovinos manifesta-se principalmente como mastite, a qual se apresenta não responsiva ao tratamento, e resultando em perdas econômicas de até 50% na produção de leite. Em humanos, pode causar distúrbios gastrointestinais por consumo de queijo fresco e de leite cru proveniente de vacas com mastite. Também foram descritos casos de lesões de pele e unhas, por contato freqüente com terra, plantas e animais (Katona *et al.* 2001, Sidrim *et al.* 2004, Yamamura 2006).

No estuário da Lagoa dos Patos, a primeira ocorrência de espécies de *Prototheca* spp. (*Prototheca zopfii* e *Prototheca whickeramii*), foi relatada por Lobato (2011), sendo os isolados obtidos a partir de sedimento de uma área de marisma. Segundo este autor, áreas de marismas, caracterizadas pela sua alta produtividade orgânica em ambientes estuarinos, são excelentes locais para a proliferação deste tipo de organismos.

Foi observado neste estudo nos locais de amostragem Barra e Museu um aumento no número de gêneros e isolados nos meses de outubro a dezembro com posterior queda. Este incremento no número de gêneros está provavelmente relacionado ao incremento da temperatura da água.

Fungos presentes em ambiente aquático e marinho têm sua distribuição afetada pela temperatura da água (Shearer *et al.* 2007, Raja *et al.* 2009, Wong *et al.* 1998). A faixa de temperatura em que os fungos foram isolados neste

estudo variou entre 14 e 23°C, portanto abaixo da temperatura ótima para crescimento para a grande maioria das espécies de fungos está entre 25 - 30 °C (Alexopoulos *et al.* 1996). Entretanto certas espécies de fungos consigam crescer e produzir estruturas de resistência para sobreviver em temperaturas extremas (Alexopoulos *et al.* 1996). Por outro lado, Griffin (1981) cita que fungos marinhos necessitam temperaturas entre 25 e 30 °C para se reproduzir. No entanto pouco se sabe ainda sobre a distribuição de ascomicetos, que foram a grande maioria de nossos isolados, com relação à sua resposta a temperatura da água (Gomes *et al.* 2007).

Mouton *et al.* (2011), conduziram um estudo da diversidade e caracterização de fungos cultiváveis do sedimento marinho St. Helena Bay, África do Sul e encontraram que, para a maioria dos isolados, a temperatura ótima de crescimento era 26 °C. Porém, alguns isolados que cresceram em temperatura de 37 °C. Todos também foram capazes de crescer a 15 °C e alguns em 4 °C. Por outro lado, Wong *et al.* (1998) consideram que é difícil determinar o quanto a temperatura afeta a distribuição de fungos de água doce, pois ainda existem muitas regiões sub-amostradas, e algumas espécies parecem ser comuns tanto em clima temperado como tropical (Raja *et al.* 2009).

Em ambiente estuarino parece ocorrer mais cepas de fungos característicos de água doce, onde o crescimento ótimo se a baixas concentrações de NaCl, pois a salinidade também governa a distribuição dos fungos nestes ambientes (Shearer, 1972). Porém alguns estudos têm citado alterações na composição de fungos de estuários, que poderiam ser influenciadas por ambientes como marismas, que podem abrigar certas

espécies de fungos marinhos (Johnson & Sparrow, 1961, Shearer, 1972, Tsui & Hyde 2004).

Entretanto, mesmo fungos isolados de ambientes marinhos parecem sofrer influência da salinidade. Por exemplo, o estudo de Tarman *et al.* (2011), conduzido na Indonésia, para selecionar as condições de cultura adequadas para a produção de compostos bioativos, mostrou que a salinidade do meio de cultura afeta o crescimento fúngico.

Com relação ao fato do gênero *Tilletiopsis* ter sua presença influenciada pela baixa salinidade, como demonstrado pela análise estatística, autores como Mueller *et al.* (2004) relatam que a salinidade é um fator limitante ao crescimento dos fungos, especialmente aqueles provenientes de ambientes límnicos. Além de afetar o crescimento, a produção de metabólitos destes organismos também sofre influência da salinidade (Tarman *et al.* 2011).

A presença do gênero *Tilletiopsis* neste estudo também foi influenciada negativamente pela concentração de fosfato. Em ambientes aquáticos, Iqbal (1976), observou que a esporulação de hifomicetos aquáticos é afetada pelo fosfato, com a inibição da esporulação destes fungos quando na presença de altas concentrações deste nutriente. Alguns estudos que relacionaram a ocorrência de fungos em ambientes aquáticos com fosfato revelam contradições, tais como os estudos de Sridhar & Bärlocher (2000) e Gulis & Suberkropp (2003), que mostraram que um aumento da concentração de fosfato leva a uma maior atividade de decomposição de substratos em ambientes aquáticos. Entretanto, no estudo de Rosemond *et al.* (2002) não foi observado qualquer efeito do fosfato na decomposição de folhas pelos fungos.

Além destes fatores, verificou-se que a ocorrência do gênero *Tilletiopsis* esteve relacionada positivamente com a concentração de nitrito + nitrato. Sendo assim, a relação positiva observada entre *Tilletiopsis* e estes nutrientes nitrogenados poderia ser resultado de um sub-produto do metabolismo secundário deste fungo (Killham 1986).

A presença de Leveduras neste estudo esteve relacionada negativamente com os nutrientes nitrito+nitrato e com pH. Quanto ao pH, o valor ótimo deste parâmetro para diferentes tipos de fungos pode variar, mas a maioria destes crescem melhor em pH de 4 a 7 (Alexopoulos *et al.* 1996). Alguns autores como Botha (2011), citam que leveduras são organismos que possuem uma grande plasticidade adaptativa, podendo sobreviver em variações de pH entre 4,0 e 9,0. De maneira similar, Oswal *et al.* (2002), em seu estudo com leveduras marinhas utilizadas para o tratamento de água, observaram que cepas da levedura *Yarrowia* têm habilidade de crescer numa variação de pH de 3,0 a 8,5 tanto em água do mar como em água doce.

Neste estudo foi verificada uma relação negativa das leveduras com as concentrações de nitrito+nitrato. As leveduras são capazes de utilizar uma grande variedade de compostos como fontes de nitrogênio (Barnett *et al.* 1990), no entanto o uso de nitrito + nitrato é restrito para poucas espécies de leveduras de diferentes gêneros, e curiosamente algumas leveduras, como por exemplo, *Debaryomyces*, que utilizam nitrito, mas não nitrato.

Os resultados deste estudo comprovam que o estuário da Lagoa dos Patos apresenta uma considerável diversidade de gêneros de fungos, com ocorrências específicas para os diferentes ambientes estudados. Não foi verificada uma variação sazonal clara, mas parece que a temperatura da água

tem grande importância na distribuição destes organismos. Entretanto, novos estudos são necessários para se identificar as espécies que ocorrem nestes ambientes e de que forma fatores abióticos podem controlar sua variabilidade temporal e distribuição espacial.

## REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J, MIMS, CW, BLACKWELL, M. 1996. Introductory Micology. 4<sup>th</sup>. ed. John Wiley & Sons, New York. 869p.
- BARNET, HL, HUNTER, BB. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. APS Press. St. Paul, Minnesota. 218p.
- BARNETT, JA, PAYNE, RW, YARROW, D. 1990 Yeasts: Characteristics and Identification. Cambridge University Press, Cambridge.
- BOTHA, A. The importance and ecology of yeast in soil. *Soil. Biol. & Biochem.*, 43: 1-8.
- BURGAUD, G, LE CALVEZ, T, ARZUR, D, VANDENKOORNHUYSE, P, BARBIER, G. 2009. Diversity of culturable marine filamentous fungi from deep-sea hydrothermal vents. *Environ. Microbiol.*, 11:1588–600.
- BUSTA, FF, PETERSON, EH, ADAMS, DM, JOHNSON, MG. 1984. Clony count method. In: Speck, ML., (ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington D.C. 62-77.

- CROUS, PW, GAMS, W, STALPER, JA, ROBERT, V, STEGEHUIS, G. 2004. MycoBank on line initiative to launch mycology into the 21<sup>st</sup> century. *Study. Mycol.*, 50:19-22.
- DOMSH, KH, GAMS, W, ANDERSON, TH. 2007. Compendium of soil fungi. IWM, Verlag, San Francisco.
- EISMA, D. 1993. Suspend matter in aquatic environment. Springer Verlag. Berlin. 315p.
- FARACO, BFC, FARACO, AF. 1974. Poluição hídrica micológica. *Rev. Bras. Med.*, vol. 33, no. 11, p. 385-388.
- GESSNER, MO. 1997. Fungal biomass, production and sporulation associated with particulate organic matter in streams. *Limnetica.*, 13:33–44
- GOMEZ, DNF, CAVALCANTI, MAQ, FERNANDES, MJS, LIMA, DMM, PASSAVANTE, JZO. 2008. Filamentous fungi isolated from sand and water of “Bairro Novo” and “Casa Caiada” beaches, Olinda, Pernambuco, Brazil. *Braz. J. Biol.*, 68(3): 577-582.
- GRIFFIN, DH. 1981. Fungal Physiology. Canada: John Wiley & Sons. 383p. ok
- GULLIS, V, SUBERKROPP, K. 2003. Effect inorganic nutrients on relative contributions of fungi and bacteria to carbon flow from submerged decomposing leaf litter. *Microb. Ecol.*, 45, 11-9.
- GUTIÉRREZ, MH, PANTOJA,S, TEJOS, E, QUINONES, RS . 2011. The role of fungi in processing marine organic matter in the upwelling ecosystem off Chile. *Mar. Biol.*, 158:205–219
- HELLMMAN, H. 1996. Organische Spurestoffe in Gewässerschwebstoffen. In: Handbuch Angewandte Limnologie. Edited by Steinberg, Bernhardt , Klapper. CapVII, 3.1, 1-45.

- HERNÁNDEZ-VERA, E. 1982. Biota micótica de la zona supralitoral, entremareas y sublitoral de la costa norte y sur de Puerto Rico. Ph.D. Tesis, University of Puerto Rico, Mayag, R, Puerto Rico. 122 pp.
- HERNÁNDEZ-VERA, E, ALMODÓVAR, LR. 1983. *Gonyaulax tamarensis* Lebour (Pirrofita) y *Falkenbergia hillebrandii* (Barnet) Falkenberg (Rodofita), dos organismos con capacidades fungistades f de las costas de Puerto Rico. *Science-Ciencia.*, 10: 24-26.
- HERNÁNDEZ-VERA, ALMODEZ-V, LR. 1984. El crecimiento de algunos hongos em diferentes concentraciones de agua de mar. *Science-Ciencia.*, 11:59-65.
- HICKENBICK, GR, FERRO, AL, ABREU, PC. 2004. Produção de detritos de macrófitas emergentes em uma marisma do estuário da Lagoa dos Patos: taxas de decomposição e dinâmica microbiana. *Atlântica.*, Rio Grande; 26: 61-75.
- HYDE, KD. 1997. Biodiversity of tropical microfungi. Hong Kong University Press, Hong Kong.
- HYDE, KD, SARMA, VV, JONES, EBG. 2000. Morphology and taxonomy of higher marine fungi. In: *Marine Mycology - A Practical Approach* (eds. K.D. Hyde and S.B. Pointing) Fungal Diversity Research Series, 1: 172-204.
- IMBODEN, DM, LERMAN, A. 1978. Modelos químicos de lagos. Em Lerman, A., ed. *Lagos: química, geología, física*. London: Springer. p. 341-356.
- IQBAL, SH. 1976. Effect of pH on sporulation of freshwater hyphomycetes. *Biologia.*, 143-153.

- JOBARD, M, RASCONI, S, SIME-NGANDO, T. 2010. Diversity and functions of microscopic fungi: a missing component in pelagic food webs. *Aquat. Sci.*, 72:255–268.
- JONES, EBG, SAKAYARO, J, SUETRONG, S, SOMRITHIPOL, S, PANG, KL. 2009. Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. *Fungal Divers.*, 35, 1–187.
- JOHNSON, TW, SPARROW, FK 1961 – Fungi in Oceans and Estuaries. J. Cramer, Weinheim.
- KATONA, T, HUSZENICA, FG. 2001. Review of microbiological, pathological and clinical aspects of mastitis caused by *Prototheca zopfii*. *The veterinary Quarterly.*, 23, n.2, 58-61.
- KILHAM, K. 1986. Heterotrophic nitrification. In: JI Prosser (Ed.) Nitrification. IRL Press, Oxford, p 117–126.
- KOHLMEYER, J, KOHLMEYER, E. 1979. Marine Mycology. The Higher Fungi. Academic Press, New York.
- LARASHATI, S, ILYAS, M. 2009. Abundance and Diversity of Mould Inhabiting Muara Layang Estuary Sediment, Bangka Belitung Islands. *Biodiversitas.*, Vol. 10, No. 2, pp. 76-80.
- LOUREIRO, STA, CAVALCANTI, MAQ, NEVES, RP, PASSAVANTE, JZO. 2005. Yeasts isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco state, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 36: 333-337.
- MCULLAGH, P, NELDER, JA. Generalized linear models 2.ed. - London : Chapman & Hall, 1997. 511p.

- MATTEDE, MGS, NASCIMENTO, FF, MATTEDE, AF, JUNIOR, LP. 1986. Flora micótica das praias oceânicas poluídas e não poluídas em clima de verão. *Cienc. Cult.*, vol. 38, no. 4, p. 664-670.
- MBATA, TI, OGIEHOR, SI, OBELEAGU, MN. 2008. Isolation of filamentous fungi from Yardenit- Baptismal site on the Jordan River. *Sudanese Journal of Public Health*, vol 3 (4).
- MENDOZA-SASSI, RA, COSTA, CFS, SCAINI, CJ, ALMEIDA, PES, GATTI, FAA, SILVEIRA, ES, MATA, MM, HALLAL, E, GIOIA, CC, RAMOS, DF, FALCHI, LR, GUIMARÃES, FM, RAMOS, T, SOUZA, D, LOBATO, R, SOUZA, NC, MARTINEZ, AMB (no prelo). “Microrganismos patogênicos em amostras de água no porto de Rio Grande: Um problema de saúde pública.” *Vitalle: Revista de Ciências da Saúde* – ISSN impresso 1413-3563 e ISSN online 2177-7853.
- MEIRELES, MCA, NASCENTE, PS. 2009. *Micologia Veterinária*. Pelotas, Editora Universitária, UFPEL,. 456p.
- MOUTON, M, POSTMA, F, WILSENACH, J, BOTHA, A. 2012. Diversity and Characterization of Culturable Fungi from Marine Sediment Collected from St. Helena Bay, South Africa. *Microb. Ecol.*, 64: 311–319. OK
- MUELLER, GM, BILLS, GF. 2004. Introduction. In: Mueller, GM, Bills, GF, Foster, MS. (eds). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, San Diego, p. 1-4.
- NIEVES-RIVERA, AM. 2005. *Coastal Mycology of Puerto Rico: A Survey and Biological Aspects of Marine, Estuary, and Mangrove Fungi*. [Dissertation]. Mayaguez, Puerto Rico: University of Puerto Rico.

- OLIVEIRA, LG, CAVALCANTI, MAQ, PASSAVANTE, JZO, FERNANDES, MJS, LIMA, DMM. 2011. Filamentous fungi isolated from Candeias Beach, Pernambuco, Brazil. *Hoehnea.*, 38 (2): 215-220.
- OSWAL, N, SARMA, PM, ZINJARDE, SS, PANT, A.2002. Palm oil mill effluent treatment by a tropical marine yeast. *Bioresour. Technol.*, 85, 35–37.
- PINTO, IMA, CAVALCANTI, MAQ, PASSAVANTE, JZO. 1992. Hongos filamentosos aislados Del y el água em la playa de Boa Viagem (Recife, PE, Brasil). *Boletín Micológico.*, 7:39-45.
- PURCHIO, A., GAMBALE, W, PAULA, CR. 1988. Molds from some beaches in the Southern area of São Paulo state (Baixada Santista), Brazil. *Rev. Microbiol.*, vol. 19, no. 2, p. 166-171.
- PUTZKE, J, PUTZKE, MTL. 2002. O reino dos fungos. Volume 2. Editora Edunisc. Santa Cruz do Sul. 829p.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <<http://www.R-project.org>>.
- RAJA, HA, SCHMIT, JP, SHEARER, CA 2009. Latitudinal, habitat and substrate distribution patterns of freshwater ascomycetes in the Florida Peninsula. *Biodivers. Conserv.*, 18, 419–455.
- RICHARDS, TA, JONES, MDM, LEONARD, G, BASS, D. 2012. Marine Fungi: Their Ecology and Molecular Diversity. *Annu. Rev. Marine. Sci.*, 4: 495-522.
- RIDELL, R. W. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia.*, 42: 265-70.
- RILEY, G.A. (1963). Organic aggregates in sea water and the dynamios of their formation and utilization. *Limnol. Ooceanogr.*, 8, 372-381.

- ROSEMOND, AD, PRINGLE, CM, RAMIREZ, A, PAUL, MJ, MEYER, JL. 2002. Landscape variation in phosphorus concentration and effects on detritus-based tropical streams. *Limnol. Oceanogr.*, 47: 278-89.
- SARQUIS, MIM, OLIVEIRA, PC. 1996. Diversity of microfungi in the sandy soil of Ipanema Beach, Rio de Janeiro, Brazil. *J. Basic. Microbiol.*, vol. 36, no. 1, p. 51-58.
- SHEARER, CA, DESCALS, E, KOHLMAYER, B, KOHLMAYER, J, MARVANOVA, L, PADGET, D, PORTER, D, RAJA, HA, SCHMIDT, JP, THORNTON, HA, VOGLYMAYR, H. 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodivers. Conserv.*, 16, 49–67.
- SHEARER, CA. 1972. Fungi of the Chesapeake Bay and its tributaries. III. The distribution of wood inhabiting ascomycetes and *fungi imperfecti* of the Patuxent River. *Am. J. Bot.*, 59, 961–969.
- SIDRIM, JCC; ROCHA, MFG. 2004. Prototecose. In: Micologia médica à luz de autores contemporâneos, Rio de Janeiro, Guanabara. p. 290-295.
- SRIDHAR, KR, BÄRLOCHER, F. (2000). Initial colonization, nutrient supply, and fungal activity on leaves decaying in streams. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1114-9.
- STRICKLAND, JD. H, PARSON, TR. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa. 310p.
- TARMAN, K, LINDEQUIST, U, WENDE, K, PORZEL, A, ARNOLD, N, WESSJOHANN, LA. 2011. Isolation of a New Natural Product and Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Extracts from Fungi of Indonesian Marine Habitats. *Mar. Drugs.*, 9, 294-306.

- TSUI, CKM, HYDE, KD. 2004 – Biodiversity of fungi on submerged wood in a stream and its estuary in the Tai Ho Bay, Hong Kong. *Fungal Divers.*, 15, 205–220.
- UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Intergovernmental Oceanographic Commission. Manual and Guides 12, Paris.
- WONG, WSW, YUEN, TK. 1998. Role of fungi in freshwater ecosystems. *Biodivers. Conserv.*, 7, 1187–1206.
- YAMAMURA, AMM. 2006. Fatores predisponentes associados à mastite bovina causada por *P. zophii*. Doutorado em Ciência Animal, Universidade Federal de Londrina. 69p.

### **CAPITULO III**

# COLONIZAÇÃO DE FUNGOS DURANTE A DECOMPOSIÇÃO DE TRÊS ESPÉCIES DE MACRÓFITAS EMERGENTES EM UM MARISMA DO ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS, RIO GRANDE , RS

## RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a colonização de fungos fúngica e concentração de carbono e nitrogênio do detrito formado durante a decomposição de três espécies de macrófitas emergentes (*Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora* e *Scirpus maritimus*) em um marisma no estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande, RS. Os gêneros de fungos isolados foram: *Acremonium*, *Amblyosporium*, *Bispora*, *Botryoderma*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Gonatobotriys*, *Microsporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia*, *Rhynchosporium*, *Scedosporium*, *Thallospora*, *Tilletiopsis* e *Trichophyton*. O processo de decomposição em *S. densiflora* e *S.maritimus* apresentou-se semelhante restando, respectivamente, 65,1% e 63,8% de biomassa remanescente de cada planta após 180 dias, enquanto que *S.alterniflora* apresentou apenas 35% de biomassa remanescente neste mesmo período. A colonização e sucessão de fungos foi distinta entre as três espécies. Nenhum dos gêneros de fungos esteve presente nas três espécies de plantas e no mesmo período. Alguns gêneros foram distintos para cada espécie, como *Acremonium* e *Gonatobotriys*, que ocorreram somente em *S. maritimus*. E o gênero *Microsporium* foi observado somente em *S.alterniflora* e os gêneros *Amblyosporium*, *Scedosporium*, *Thallospora* e *Trichophyton* foram encontrados apenas em *S.densiflora*. *Botryoderma*, foi isolado de *S.alterniflora*

e *S. densiflora*. A maior diversidade de gêneros observada durante a decomposição de *Scirpus maritimus* parece estar associada à maior quantidade de nitrogênio na biomassa desta planta. Entretanto, o aumento de N observado na biomassa detrítica de *S. maritimus* pode ter resultado da incorporação deste nutriente pelos fungos, o que melhorou a qualidade nutricional do detrito desta planta.

Palavras-Chave: Estuário da Lagoa dos Patos, fungos, macrófitas.

## INTRODUÇÃO

Da matéria orgânica particulada produzida nos estuários, apenas uma pequena parte está disponível para o consumo direto por peixes, crustáceos e moluscos. Para que haja o consumo da biomassa produzida por macrófitas e macroalgas é necessária a prévia colonização da biomassa morta por bactérias e fungos, que realizam sua decomposição e incrementam a qualidade nutricional das partículas com compostos nitrogenados, tornando as partículas mais nutritivas e palatáveis aos detritívoros (Witkamp & Van Der Drift 1961, Kaushik & Hynes 1968, Bärlocher & Kendrick 1973, 1974, Bärlocher 1992).

Ao realizar a decomposição, os fungos convertem eficientemente a matéria orgânica vegetal em biomassa fúngica na forma de micélio e estruturas reprodutivas (Newell & Porter, 2000). Alguns autores como Gessner & Chauvet, (1994); Methvin & Suberkropp, (2003), citam que a biomassa fúngica pode ser responsável por até 23% da massa total de detrito.

Por outro lado, um estudo realizado em estuários da Califórnia, analisando comunidades de fungos ascomicetos presentes nos estágios iniciais

da decomposição de *Spartina alterniflora*, *S. densiflora* e *S. foliosa*, mostrou existir diferenças significativas nas comunidades de fungos decompositores entre as espécies estudadas, concluindo que um dos fatores para que isto ocorra poderia ser as diferenças morfológicas entre as espécies de macrófitas são importantes (Lyon *et al.*, 2011).

A região estuarina da Lagoa dos Patos, RS, com uma área de 971 km<sup>2</sup>, apresenta elevada taxa de produtividade primária e uma considerável diversidade biológica (Seeliger *et al.*, 1998). Esta região serve como área de reprodução e berçário para muitas espécies marinhas, que encontram neste ambiente proteção e disponibilidade de alimentos. Ao longo das margens na parte inferior do estuário da Lagoa dos Patos existem áreas irregularmente alagadas que são dominadas por macrófitas como a *S. alterniflora* Loiset *et Deslang*, *S. densiflora* Brong., *S. maritimus* L., *Scirpus olneyi* A. Gray e *Juncus kraussii* Hochst. Estas plantas recobrem cerca de 50% da superfície das marismas (Costa *et al.* 1997) e são responsáveis pelo maior aporte de matéria orgânica particulada a este ecossistema (Seeliger *et al.*, 1998). A média de produção primária aérea líquida anual de três espécies de macrófitas dominantes nesta área (*S. alterniflora*, *S. densiflora* e *S. maritimus*) é de 808g C m<sup>-2</sup> ano<sup>-1</sup> (Seeliger *et al.*, 1998).

Neste ecossistema predomina a cadeia alimentar detritívora, onde a biomassa de plantas superiores é decomposta por bactérias e fungos, tornando a matéria e energia das plantas disponível a organismos aquáticos consumidores (Seeliger *et al.* 1998). Trabalhos conduzidos no estuário da Lagoa dos Patos com *Scirpus maritimus* (Costa *et al.*1998), *S. densiflora* (Peixoto e Costa, 2004) e *S. alterniflora* (Cunha *et al.* 2005), relatam que a

maior parte da produção primária destas plantas se transforma em detrito, principalmente por não ocorrer o consumo direto destas por herbívoros.

No Brasil ainda são escassas as informações sobre fungos associados a macrófitas durante o processo de decomposição em ambientes aquáticos. A grande maioria dos estudos existentes foi conduzida, principalmente, com folhas submersas em ambientes de água doce, como por exemplo, no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga e lagos em Itapeverica (SP) (Schoenlein-Crusius & Milanez, 1989, Schoenlein-Crusius *et al.* 2009). E alguns autores avaliaram a colonização radicular de espécies de macrófitas aquáticas, como o trabalho de Marins *et al.* (2009), em macrófitas de corpos de água na planície de inundação do Alto Rio Paraná. Estes últimos autores observaram que algumas espécies de macrófitas não apresentaram colonização fúngica, enquanto outras apresentaram co-ocorrência de espécies.

Por último deve-se ressaltar o trabalho de Nunes *et al.* (2011), que avaliaram a atividade enzimática de fungos límnicos durante a decomposição de três macrófitas aquáticas da Lagoa do Óleo em São Paulo, Brasil. Os autores consideram que microrganismos como fungos podem fragmentar macromoléculas dos principais componentes do detrito destas plantas (lignina, celulose, hemicelulose) através de ação de enzimas.

No estuário da Lagoa dos Patos, Hickenbick *et al.* (2004), estudando a produção de detritos das macrófitas emergentes *S. alterniflora*, *S. densiflora*, *S. maritimus* e *S. olneyi*, observaram uma grande quantidade de hifas e esporos de fungos nas macrófitas em decomposição, não tendo sido feito, entretanto, a identificação destes organismos. Além desta referência, não existe qualquer outra pesquisa relacionando a decomposição de macrófitas e os gêneros de

fungos que ocorrem neste ambiente. Sendo assim, este estudo objetivou avaliar a colonização de gêneros de fungos em três espécies de macrófitas emergentes de um marisma no estuário da Lagoa dos Patos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Local de Estudo*

Foram realizadas em março de 2009 coletas de *Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora* e *Scirpus maritimus*, incluindo hastes, base do colmo e folhas, em um marisma na Ilha da Pólvora, no estuário da Lagoa dos Patos (Fig. 1).

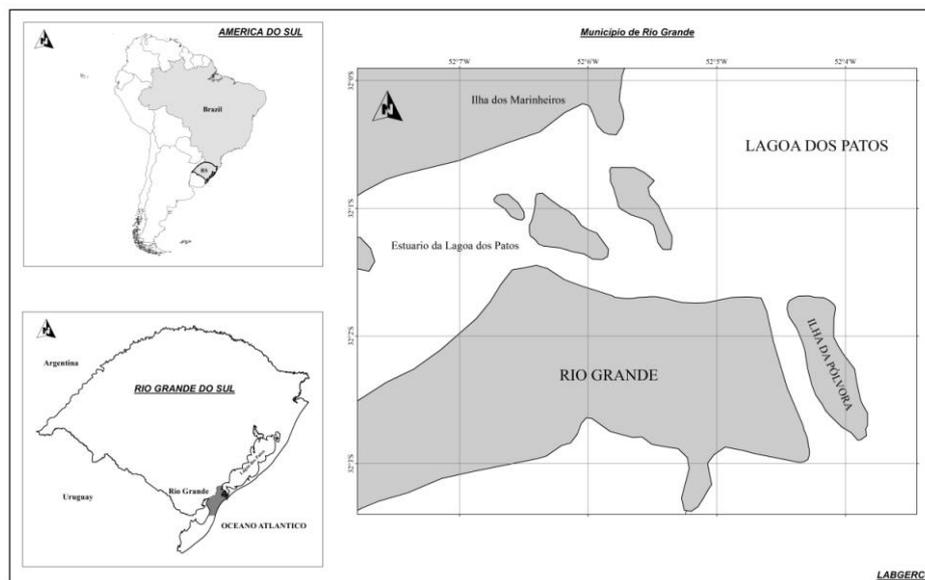


Figura 1. Local de estudo. Marisma da Ilha da Pólvora. Rio Grande – RS

Os pedaços de planta foram secos a 60°C por 24 horas, utilizando-se uma estufa FANEM (mod. 315 SE). Em seguida, as folhas e hastes de cada espécie foram separadas em lotes de aproximadamente 10 g (Peso inicial –

Psi) (Balança KERN Mod. 430-21, precisão de 0,001 g), e cada lote colocado em pequenos sacos denominados “litter bags” (Wetzel & Likens, 1991). Os “litter bags” foram confeccionados com telas de nylon, com aberturas da malha de 1,5 X 1,5 mm e dimensões de 10 x 10 cm cada. No interior de cada “litter bag”, foi colocada uma etiqueta numerada para permitir a posterior identificação da amostra.

Um total de 75 “litter bag” (25 para cada espécie) foram divididos em grupos de cinco sacos, unidos por um fio de nylon e devolvidos ao campo em março de 2009, próximo ao local das coletas, em posição em que todas as amostras fossem submetidas as mesmas condições de maré. As retiradas destes “litter bags” para análise do material remanescente ocorreram em 7, 15, 30, 90, 180 dias após a devolução dos “litter bags” ao campo. Em cada ocasião era retirado um grupo de 5 sacos por planta.

Para cada amostragem, três “litters bags” foram utilizados para determinação do peso seco remanescente, utilizado para calcular a taxa de decomposição e também para a análise de C e N através de um CHN Analyzer (Wallner-Kersanach, 2010). O material contido nos dois “litters bags” restantes foi utilizado para o isolamento e identificação de fungos presentes no detrito das macrófitas estudadas nos diferentes tempos de coleta.

### ***Isolamento e Identificação dos fungos***

O material do “litters bag” destinado a identificação de fungos foi cortado em pedaços e estes foram pressionados sobre placas de Petri, contendo ágar Sabouraud e ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (Acumedia) e

mantidos em estufa bacteriológica a 25- 30 a °C. (Busta *et al.* 1984), com observações diárias durante 7 dias.

A identificação, em nível de gênero, foi baseada nas características de macro- e de micromorfologia dos fungos. Foram também observados a velocidade de crescimento (tempo da semeadura até visualização inicial da colônia), aspecto superficial do micélio e pigmentação do verso e reverso dos cultivos (Alexopoulos *et al* 1996, Barnett & Hunter,1998), Putzke & Putzke (2002). As características micromorfológicas foram observadas utilizando-se a Técnica de Microcultivo (Ridell,1950).

### ***Análise da Decomposição***

O material dos “litters-bag” retirado do campo foi seco em estufa (FANEM mod. 315 SE) a 60°C por 24 horas e pesado novamente em balança (Balança KERN Mod. 430-21, precisão de 0,001g), para determinação do peso final.

Foi utilizado o Modelo de Regressão Exponencial Simples, para análise das duas variáveis: tempo de permanência dos litter-bags no campo e porcentagem de decomposição das plantas (Mazucheli & Achcar, 2002).

A taxa de decomposição determinada pela equação:

$$X_t = X_0 e^{-kt},$$

onde  $x_t$ = % de matéria orgânica remanescente,  $t$ = tempo,  $k$  = constante de decomposição,  $X_0$ = intercepto (Foote e Reynolds, 1997).

Esta análise foi feita para o tempo total em que os “litter bags” estiveram em campo e também para períodos específicos (0-15 e 15-180 dias), devido aos diferentes padrões de decomposição observados nestes períodos.

### ***Carbono e Nitrogênio orgânico particulado***

A análise de Carbono (C) e Nitrogênio (N) nas amostras das macrófitas coletadas foi realizada utilizando um analisador Elementar CHNS/O 2400 Series II da Perkin Elmer e seguindo o protocolo da Perkin Elmer. Para isto foram pesados entre 2,5 a 3,0 mg da amostra seca e macerada em uma cápsula de estanho. O valor do peso foi adicionado à programação do aparelho, sendo a amostra então analisada e as concentrações de C e N expressas como percentual do peso da amostra. A calibração do equipamento e o controle de qualidade da análise foram realizados utilizando-se o material de referência certificado (Wallner-Kersanach, 2010).

## **RESULTADOS**

### ***Isolados identificados/planta***

Foram isolados os gêneros *Acremonium*, *Amblyosporium*, *Bispora*, *Botryoderma*, *Cercospora*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Gonatobotriys*, *Microsporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia*, *Rhynchosporium*, *Scedosporium*, *Thallospora*, *Tilletiopsis* e *Trichophyton* (Tabela 1). O maior número de gêneros fúngicos foi encontrado em *S. maritimus* (15), seguido de *S.alterniflora* (10) e *S.densiflora* (7).

Tabela 1. Ocorrência dos gêneros de fungos isolados das macrófitas emergentes do estuário da Lagoa dos Patos (*Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora* e *Scirpus maritimus*) nos períodos de amostragem.

		Ascomycota											Basidiomycota		Zigomycota			
Gêneros		<i>Acremonium</i> sp	<i>Amblyosporium</i> sp	<i>Botryoderma</i> sp	<i>Bispora</i> sp	<i>Cercospora</i> sp	<i>Fusarium</i> sp	<i>Gonobotriys</i> sp	<i>Microsporium</i> sp	<i>Penicillium</i> sp	<i>Rhynchosporium</i> sp	<i>Scedosporium</i> sp	<i>Thallospora</i> sp	<i>Trychophyton</i> sp	<i>Rhizoctonia</i> sp	<i>Tilletiopsis</i> sp	<i>Mucor</i> sp	<i>Rhizopus</i> sp
<i>S. alterniflora</i>	7dias									x					x			
	15dias					x	x											
	30dias			x					x								x	
	90dias						x											
	180dias						x								x			
<i>S. densiflora</i>	7dias											x						
	15dias			x														
	30dias			x														
	90dias						x											
	180dias		x															
<i>S. maritimus</i>	7dias							x	x	x						x	x	
	15dias																	x
	30dias				x										x			
	90dias	x			x	x									x		x	
	180dias	x													x			x

Dentre os isolados, *Acremonium*, *Amblyosporium*, *Bispora*, *Botryoderma*, *Cercospora*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Gonobotriys*, *Microsporium*, *Penicillium*, *Rhynchosporium*, *Scedosporium*, *Thallospora*, *Trichophyton* são fungos ascomicetos (filo Ascomycota). *Rhizoctonia* e *Tilletiopsis* são basidiomicetos (filo Basidiomycota), enquanto que *Rhizopus*, e *Mucor*, são fungos zigomicetos (filo Zygomycota).

Os gêneros de fungos apareceram em período distinto nas três espécies de plantas, havendo somente dois gêneros comuns por período entre

*S.alterniflora* e *S.densiflora*, que foram *Botryoderma* , aos 30 dias e *Fusarium* , aos 90 dias (Tabela 1). Desta forma, pode-se dizer que a sucessão de fungos nas três espécies de plantas foi distinta quanto aos gêneros e período de aparecimento durante o experimento.

Deve-se ressaltar que alguns gêneros apresentaram especificidade por planta. Por exemplo, os gêneros *Amblyosporium* , *Scedosporium* , *Thallospora* e *Trichophyton* , ocorreram somente em *S.densiflora*. *Acremonium*, e *Gonatobotriys* foram observados apenas em *S. maritimus*, enquanto que o gênero *Microsporium* esteve presente somente em *S.alterniflora*.

### **Decomposição**

As taxas de decomposição das três espécies para os diferentes períodos estão apresentadas na Tabela 2.

Com relação aos valores da taxa de decomposição (k) das três plantas, *S. alterniflora* apresentou os maiores valores percentuais, enquanto que *S. densiflora* e *S. maritimus* apresentaram valores similares, sendo que no final do experimento (180 dias), todas apresentaram os valores diminuídos e similares. A taxa de decomposição diária de *Spartina alterniflora* foi de 0,36%/dia, *S. maritimus* foi de 0,20%/dia e de *S. densiflora* foi de 0,19%/dia (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de taxa de decomposição (média e k) (%/dia) das três plantas em diferentes períodos durante o experimento

Macrófita	Valor médio %	0- 180 dias	0-15 dias %	15-180 dias %
<i>Spartina alterniflora</i>	0,3	0,4	5,2	0,2
<i>Spartina densiflora</i>	0,1	0,2	0,8	0,2
<i>Scirpus maritimus</i>	0,2	0,2	1,1	0,1

k: Constante de decomposição

### *Scirpus maritimus*

Esta apresentou no final do período 63,8% da biomassa inicial, com declínio gradual durante todo o período de estudo (Figura 2A). Em média houve uma redução de 0,20% da biomassa inicial por dia.

Pelo modelo de Regressão Exponencial Simples obtivemos as seguintes equações:

$$x_t = 92,97e^{-0,002t} \quad R^2 = 0,773 \quad (0 \text{ a } 180 \text{ dias}),$$

$$x_t = 101,5e^{-0,011t} \quad R^2 = 0,819 \quad (0-15 \text{ dias}),$$

$$x_t = 85,54e^{-0,001t} \quad R^2 = 0,699 \quad (15 \text{ a } 180 \text{ dias}).$$

### *Spartina alterniflora*

Nesta espécie houve um rápido decréscimo inicial, com redução de aproximadamente 30% do peso seco inicial, nos sete primeiros dias. Do período de 15 a 30 manteve-se em aproximadamente em 50% da biomassa inicial e apresentou uma diminuição gradual, chegando a 35% do peso inicial em 180 dias (Figura 2B). Esta planta apresentou maior taxa de decomposição das três espécies estudadas, com uma média de 0,36% da biomassa inicial por dia.

Para a decomposição desta planta foram obtidas as seguintes equações:

$$x_t = 67,59e^{-0,004t} \quad R^2 = 0,638 \quad (0 \text{ a } 180 \text{ dias}),$$

$$x_t = 99,76e^{-0,052t} \quad R^2 = 0,978 \quad (0-15 \text{ dias}),$$

$$x_t = 51,48e^{-0,002t} \quad R^2 = 0,744. \quad (15-180 \text{ dias})$$

### *Spartina densiflora*

No processo de decomposição dos litters-bags de *S. densiflora* foi observada uma maior queda de biomassa no período entre 30 a 90 dias, apresentando 65,1% da biomassa inicial no final do experimento (Figura 2C).

As equações obtidas pelo modelo de Regressão Exponencial Simples para a decomposição desta planta foram:

$$x_t = 93,46e^{-0,002t} \quad R^2 = 0,760 \quad (0 \text{ a } 180 \text{ dias}),$$

$$x_t = 99,72e^{-0,008t} \quad R^2 = 0,718 \quad (0 \text{ a } 15 \text{ dias}),$$

$$x_t = 88,44e^{-0,002t} \quad R^2 = 0,662 \quad (15 \text{ a } 180 \text{ dias}).$$

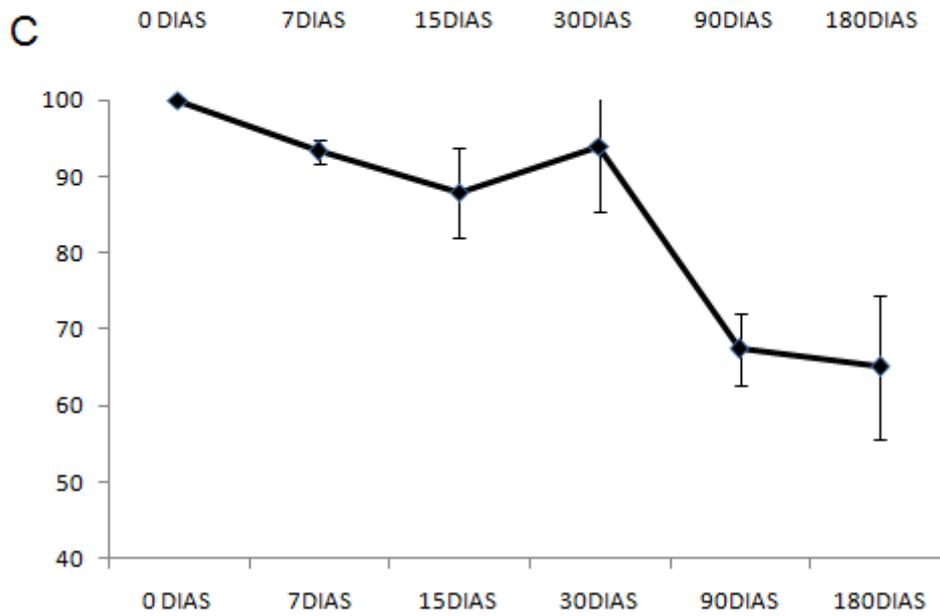
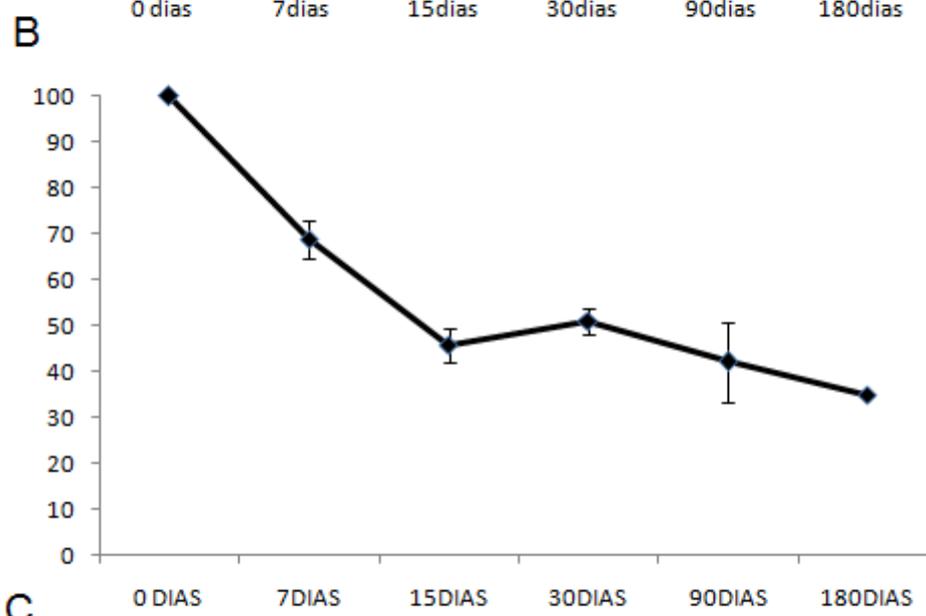
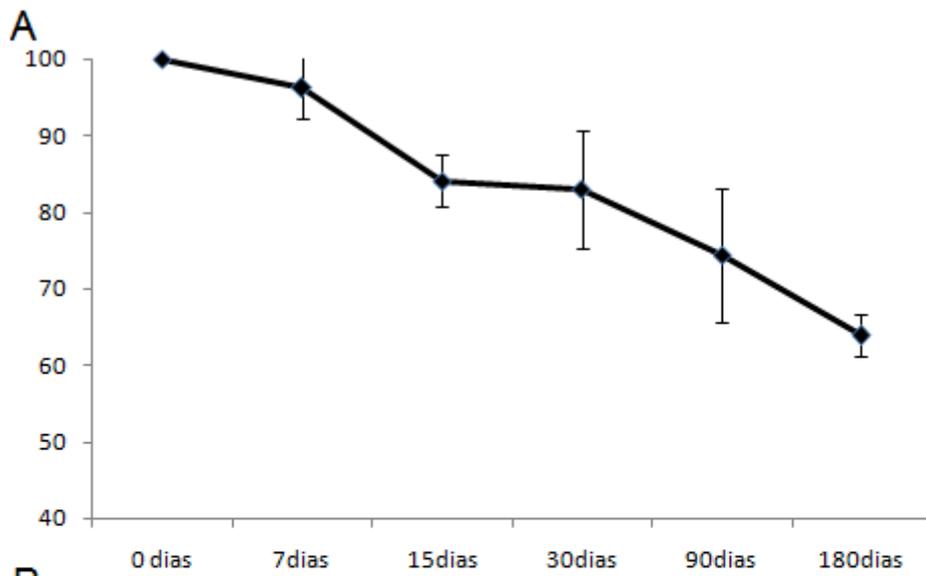


Figura 2. Percentual de biomassa remanescente de *S.maritimus* (A), *S.alterniflora* (B) e *S.densiflora* (C) ao longo de 180 dias.

### **Carbono e Nitrogênio**

#### *Spartina alterniflora*

Nos primeiros 7 dias de experimento o detrito de *S. alterniflora* apresentava 45,4% de seu peso como carbono. Medidas semelhantes foram obtidas em 15 e 90 dias, um aumento deste elemento ocorreu aos 30 dias (53,4%) e queda significativa no final do período (180 dias), quando 16,3% do detrito era composto de carbono (Figura 3).

A porcentagem de nitrogênio do material desta planta nos “litters-bag” foi semelhante em 7 e 15 dias (1,7% e 1,53%, respectivamente), apresentando um aumento em 30 e 90 dias (2%), e queda brusca em 180 dias (0,9%) (Figura 4).

A relação C:N apresentou valores variando aproximadamente entre 26 a 30 durante o experimento, com exceção do período de 180 dias que apresentou valor mais baixo (16) (Figura 5).

#### *Spartina densiflora*

O percentual de carbono no material dos “litters-bags” de *S. densiflora* foram em torno de 47% aos 7, 15 e 30 e 90 dias, e valor menor de (35,4%) no período final (180 dias) (Figura 3). Os percentuais de N apresentou pouca variação em 7 (1,1%), 30 (1,2%), 90 (1,1%) e 180 (1,2%), mas houve um valor bem baixo (0,9%) aos 15 dias (Figura 4).

A razão C:N apresentou valor maior em 15 dias (47,8), e variou de 37 a 41 nos períodos de 7, 30 e 90 dias, chegando a 29 em 180 dias (Figura 5).

### *Scirpus maritimus*

O percentual de carbono no detrito de *S. maritimus* manteve-se constantes em todas as coletas do experimento (45,6- 47,3% do peso seco) (Figura 3). O percentual de nitrogênio de *S. maritimus* apresentou-se baixo (menos que 1%) no período de coleta de 15 dias e, em torno de 2% no período de 7 e 30 dias; e o maior percentual foi obtido aos 180 dias ( 3%) (Figura 4).

A relação C:N nesta planta apresentou valores com variação de 20 a 23 nos períodos de 7, 30 e 90 dias. Aos 15 dias apresentou seu valor maior (45) e aos 180 dias seu menor valor (15) (Figura 5).

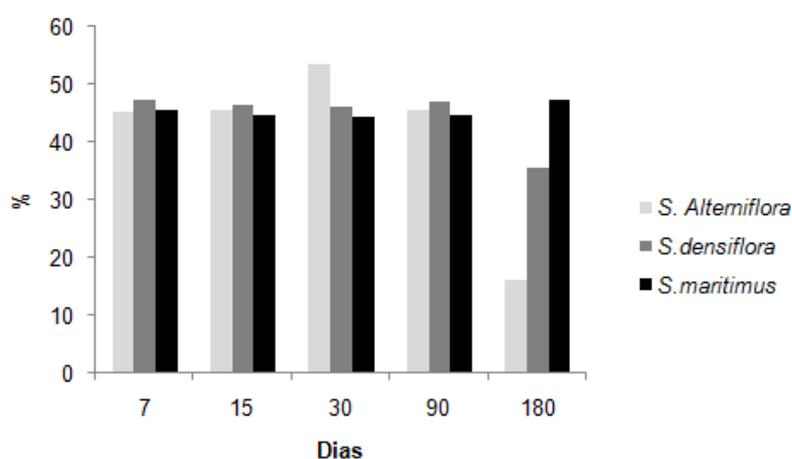


Figura 3. Níveis de Carbono (%) em *S. alterniflora*, *S. densiflora* e *S. maritimus* nos diferentes períodos de coletas .

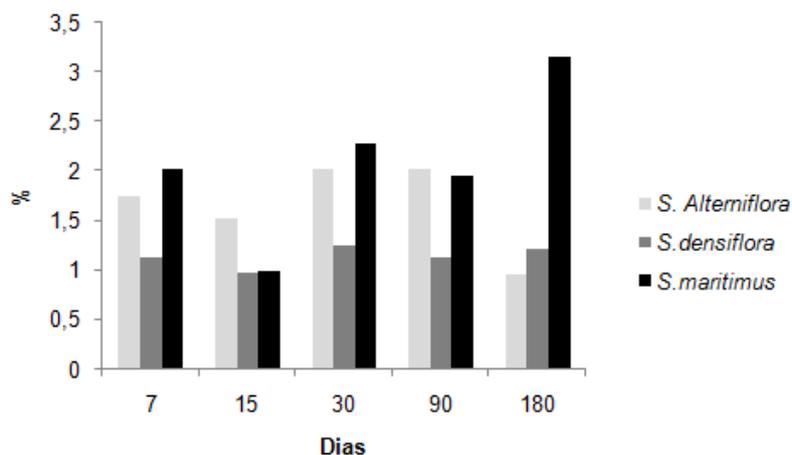


Figura 4. Níveis de Nitrogênio (%) em *S. alterniflora*, *S. densiflora* e *S. maritimus* nos diferentes períodos de coletas.

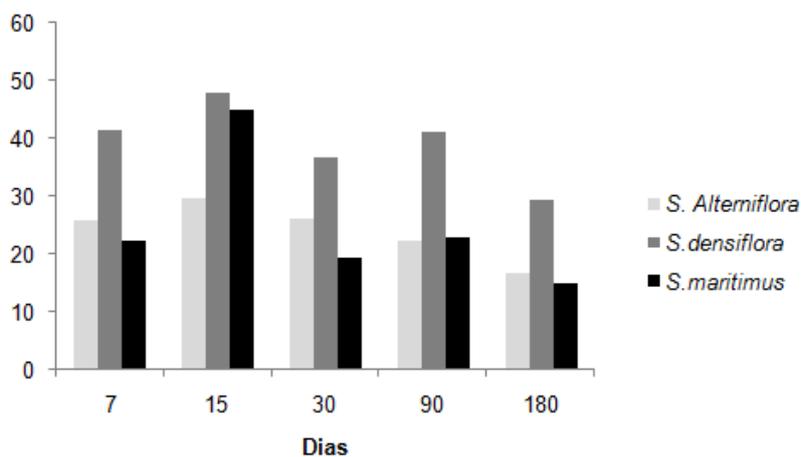


Figura 5. Razão C:N em *S.alterniflora*, *S. densiflora* e *S.maritimus* nos diferentes períodos de coletas.

## DISCUSSÃO

### ***Colonização e Sucessão Fúngica***

Determinar a composição taxonômica, o padrão de ocorrência e a dinâmica da comunidade de fungos durante a decomposição de macrófitas emergentes é importante para um melhor entendimento deste processo.

Do ponto de vista da micologia, a sucessão pode ser definida como a ocupação seqüencial, em um mesmo substrato, por um fungo (normalmente micélio), diferentes fungos, ou associações de diferentes de fungos (Rayner & Todd, 1979). As diferentes espécies de fungos substituem-se umas as outras alternando-se no tempo e espaço, onde cada uma está adaptada para ocupar nichos específicos, que se modificam devido ao próprio processo de decomposição da planta (Frankland, 1998). Desta forma, os diferentes estágios da matéria vegetal que se tornam disponíveis para a colonização, da primeira fase de decaimento até etapas mais avançadas de decomposição, são caracterizados por uma micota diferente (Apinis *et al.* 1972a, b, 1975, Luo *et al.* 2004, Van Ryckegem & Verbeken, 2005 a, b).

Fungos dominam o estágio inicial do processo de decomposição e transformam a matéria orgânica através de suas enzimas extracelulares (Newell, 2001, Newell & Porter, 2000). Em espécies de *Spartina* perdas de até 60% da matéria orgânica inicial podem ocorrer na primeira fase de decomposição (Newell & Porter, 2000).

Variações na composição de espécies de fungos durante a decomposição de macrófitas também podem ocorrer em diferentes partes da planta, onde alguns gêneros estiveram mais presentes nas partes aérea enquanto que outros na porção média dos caules de *Phragmites Australis* (Van Ryckegem *et al.* 2005).

Buchan *et al.*(2000) citam que as comunidades saprófitas de marismas, que incluem fungos, tem pouca variabilidade espacial, mas variam consideravelmente com o tempo, porém, este fato não pode ser facilmente

explicado somente pelas mudanças sucessionais, ou com relações com variáveis ambientais.

Neste estudo ocorreu o aparecimento e desaparecimento de alguns gêneros a cada coleta. Entretanto, não foi possível se caracterizar um padrão de sucessão comum às três espécies. Na verdade, os isolados apresentaram uma distribuição distintas nas três plantas e em diferentes períodos de observação. Isto pode ter se dado devido às diferentes constituições químicas e morfológicas das três espécies de plantas estudadas. Além disto, durante o processo de decomposição, a presença de outros microrganismos que não foram avaliados neste estudo, como por exemplo, bactérias, podem ter influenciado esta variabilidade de gêneros de fungos.

Em nosso estudo, os fungos pertencentes ao filo Ascomycota foram dominantes durante o processo de colonização nas três plantas. Esses fungos estão entre os principais microrganismos encontrados em plantas de marismas em decomposição (Newell, 1996; 2001a; 2001b), sendo que seu micélio pode ser encontrado na superfície, no centro oco do colmo, intra- e extracelularmente (Gessner, 1980).

Buesing et al (2009), utilizando a técnica de “fingerprint” em eletroforese em gel com gradiente de denaturação (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis” DGGE) determinaram a composição da comunidade de fungos e bactérias em uma marisma e observaram que a maioria das sequências de seus clones foram identificados como Ascomycota. Outros estudos demonstram que fungos ascomicetos também são dominantes durante o processo de decomposição de plantas em água doce (Nikolcheva e Bärlocher, 2003, Vijaykrishna et al. 2006; Shearer et al. 2007).

Entretanto, além das espécies de Ascomycota, neste estudo foram encontrados dois gêneros pertencentes ao filo Zygomycota, que foram *Rhizopus* sp e *Mucor* Shearer *et al.* (2007), relataram que zigomicetos não são normalmente encontrados na maioria dos habitats aquáticos. Entretanto, ressaltam que esta ausência pode estar relacionada a problemas metodológicos.

Nilkocheva & Bärlocher (2004), utilizando técnicas de biologia molecular para determinar a presença e contribuição de grupos fúngicos em córregos, constataram que fungos pertencentes ao filo Zygomycota estiveram presentes em baixo número e sua contribuição em biomassa foi de  $\leq 1\%$ . Além disso, a diversidade de Zygomycota em substratos celulósicos tem sido citada como essencialmente transitória, pois embora os seus propágulos possam estar presos no detrito, a sua participação na quebra destes substratos é duvidosa (Park 1972).

Também em nosso estudo foram isolados dois gêneros do filo Basidiomycota, como *Rhizoctonia*, em *S.alterniflora* e *S.maritimus* e *Tilletiopsis*, obtida no detrito de *S. maritimus*.

Segundo observações de Shearer *et al.* (2007), basidiomicetos raramente ocorrem em ambientes aquáticos, com exceção das leveduras basidiomicéticas, que podem dominar comunidades micoplanctônicas (Jones, 2009). Da mesma forma, Van Ryckegem *et al* (2005), realizando observações diretas em bainhas de folhas de *Phragmites australis* macrófita emergente, em um pântano de água salobra de um rio na Holanda, obtiveram 77 táxons, que foram identificados, onde dentre estes (43%) eram ascomicetos e somente e

somente 5% basidiomicetos, evidenciando a baixa porcentagem deste filo em ambiente aquático.

A colonização distinta nas três espécies de plantas e períodos deu-se, provavelmente, devido às mudanças químicas e físicas que ocorrem no próprio detrito durante o processo de decomposição e que afetam a comunidade microbiana. Além destas mudanças, interações entre os microrganismos dentro da comunidade, tais como relação presa-predador, podem levar a mudanças na composição dos microrganismos que colonizam o material de plantas em decomposição (Buchan *et al.* 2003).

Neste estudo a espécie de planta que mostrou maior diversidade fúngica foi *Scirpus maritimus*. Este resultado pode estar relacionado com os níveis de nitrogênio mais elevados comparados aos de *S.alterniflora* e *S.densiflora* desde o início, e que aumentando ao longo do experimento. É sabido que os fungos absorvem nitrogênio do detrito das plantas em decomposição para sua nutrição e crescimento (Mitsch & Bouchard 1998). Sanmartí & Menéndez (2007), estudando a decomposição de *S. maritimus* em uma marisma costeira do Mediterrâneo, observaram um padrão de decomposição similar ao deste estudo, onde também os níveis de nitrogênio do material detritico aumentaram durante o processo de decomposição, enquanto que a relação C:N diminuiu, sugerindo uma imobilização de nutrientes sobre estes detritos vegetais. Newell *et al.* (1996), através de experimentações com plantas em marismas, observaram que a disponibilidade de nitrogênio pode controlar a produção fúngica (tanto reprodução sexuada como assexuada), neste ambiente.

Deve-se considerar que o aumento de nitrogênio ao longo do processo de decomposição de *Scirpus maritimus* pode ter resultado da própria presença

dos fungos. Segundo Vymazal (1995), Enriquez (1993), Chimney (2006), os fungos que atuam como decompositores concentram nutrientes sobre o detrito e para Fell & Newell, (1981), os fungos podem desempenhar um papel importante na imobilização de nitrogênio, através da conversão de nitrogênio inorgânico em biomassa fúngica, resultando assim numa diminuição da proporção C:N dos detritos e melhoria de sua qualidade nutricional (Fell & Newell, 1981).

A maior diversidade fúngica observada em *S. maritimus* não parece ter contribuído para uma maior decomposição da planta. A taxa de decomposição diária (0,20%/dia) de *S. maritimus* foi menor do que a apresentada por *S. alterniflora* (0.40 %/dia) e também foi inferior a taxa medida em outro trabalho similar a este no estuário da Lagoa dos Patos (Hickenbinck et al 2004) que obteve em seu estudo 0,37%/dia.

No trabalho de Hickenbinck et al. (2004) o valor de taxa de decomposição diária de *S.maritimus* foi similar ao de *S.alterniflora*. Estes autores consideraram que esta semelhança devia-se à constituição similar do parênquima aerífero destas duas plantas e também maior superfície foliar das duas plantas em comparação com *S. densiflora*, que permitia um maior ataque dos microrganismos decompositores. Neste estudo, porém, este fato não se repetiu, o que pode ser resultado da diferença na composição da comunidade de fungos obtida para as duas plantas (Cummins 1974, Gessner 1999).

Os resultados deste estudo revelam uma considerável diversidade de fungos nas três espécies de macrófitas estudadas, com uma composição distinta por planta, não tendo sido observados padrões comuns de sucessão durante a decomposição das três espécies de macrófitas. A constituição

química e morfológica destas plantas parece ter sido o fator principal para a diferenciação na colonização de fungos e taxas de decomposição destas plantas. No entanto, mais estudos são necessários, tais como identificação em nível de espécie e atividade enzimática, para alcançar o conhecimento do papel dos fungos no processo de decomposição de macrófitas no estuário da Lagoa dos Patos.

## REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J, MIMS, CW, BLACKWELL, M. 1996. Introductory Micology. 4<sup>th</sup>. ed. John Wiley & Sons, New York. 869p.
- ADAM, P. 1993. Salt marsh Ecology. University Press, Cambridge.
- APINIS, AE, CHESTERS, CGC, TALIGoola, HK. 1972b. Microfungi colonizing submerged standing culms of *Phragmites communis* Trin. *Nova Hedwigia.*, 23: 473-480.
- BÄRLOCHER, F. 1992. Research on aquatic hyphomycetes: historical background and overview. *In*: Bärlocher, F. (ed.) The ecology of aquatic Hyphomycetes. Berlin: Springer-Verlag, pp. 1-15.
- BÄRLOCHER, F, KENDRICK, B. 1973. Fungi in the diet of *Grammarus pseudolimnaeus*. *Oikos*, 24: 295-300.
- BÄRLOCHER, F, KENDRICK, B. 1974. Dynamics of the fungal population on leaves in a stream. *J. Ecol.*, London, 62 (3): 761-791.
- BÄRLOCHER, F, MOULTON, V.1999. *Spartina alterniflora* in two New Brunswick salt marshes. I. Growth and decomposition. *Bulletin of Marine Science.*, 64(2): 299–305.

- BARLOCHER, F. 2000. Water-borne conidia of aquatic hyphomycetes: seasonal and yearly patterns in Catamaran Brook, New Brunswick, Canada. *Can. J. Bot.*, 78: 157–67.
- BARNET, HL, HUNTER, BB. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. APS Press. St. Paul, Minnesota. 218p.
- BLUM, LK, & AL MILLS 1991. Microbial growth and activity during the initial stages of seagrass decomposition. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 70: 73- 82.
- BOUCHARD, V, LEFEUVRE, JC. 2000. Primary production and macro-detritus dynamics in a European salt marsh: carbon and nitrogen budgets. *Aquat. Bot.* 67: 23–42
- CUNHA-SANTINO, MB, BIANCHINI, IJr. 2006. Modelos Matemáticos Aplicados aos Estudos de Decomposição de Macrófitas Aquáticas. *Oecol. Bras.*, 10 (2): 154-164.
- CHRISTIAN, RR. 1984. A life-table approach to decomposition studies. *Ecology*, 65(5): 1693-1697.
- BITAR, AL, ANTONIO, RM, BIANCHINI, IJr. 2002. Degradação anaeróbia de folhas e galhos, cascas e serrapilheira. *Acta limnologica Brasiliensia.*, 14(2): 17-26.
- BOUCHARD, V, MITSCH, WJ. 2005. Net primary productivity of macrophytes after five growing seasons in experimental planted and unplanted marshes.” Annual reports (Olentangy River Wetland Research Park) pp. 61-66.

- BUESING, N, FILLIPINI, M, BÜRGMANN, H, GESSNER, MO. 2009. Microbial communities in contrasting freshwater marsh microhabitats. *FEMS Microbiol Ecol.*, 69: 84–97.
- BUSTA, FF, PETERSON, EH, ADAMS, DM, JOHNSON, MG. 1984. Clony count method. In: Speck, ML., (ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington D.C. Washington D.C, American Public Health Association., 62-77.
- BUCHAN, A, NEWELL, SY, MORETA, JI, MORAN, MA. 2002 . Molecular characterization of bacterial and fungal decomposer communities in a southeastern U.S. saltmarsh. *Microb. Ecol.*, **43**:329–340.
- CASTRO, P, FREITAS, H. 2000. Fungal biomass and decomposition in *Spartina maritima* leaves in the Mondego salt marsh (Portugal). *Hydrobiologia* 428, 171–177.
- CHIMNEY, MJ, K. C. PIETRO, KC. 2006. Decomposition of macrophyte litter in a subtropical constructed wetland in south Florida (USA). *Ecological Engineering*, 4: 301-321.
- COSTA, CSB. 1997. Tidal marsh and wetland plants. In *Subtropical convergence environments: The coast and sea in the Southwestern Atlantic*, ed. U. Seeliger, C. Odebrecht, and J.P. Castello, 24–26. Berlin: Springer.
- COSTA, CSB. 1998. Production ecology of *Scirpus maritimus* in southern Brazil. *Ciência e Cultura Journal of Brazilian Association for the Advancement of Science.*, 50 (4).

- CUMMINS, KW. 1974. Structure and function of Stream Ecosystems.  
*BioScience.*, 24, 11: 631- 341.
- CUNHA, SR, ASMUS, M, COSTA, CSB. 2005. Production Dynamics of  
*Spartina alterniflora* salt marshes The estuary of Patos Lagoon (RS,  
Brazil): A simulation model approach. *Braz. J. Aquat. Sci. Technol.*,  
9(2):75-85.
- DE LA CRUZ, AA. 1975. Proximate nutrient value changes during  
decomposition of salt marsh plants.  
*Hydrobiologia.*, 43, 475-480.
- DIX, NJ, WEBSTER, J. 1995. Fungal Ecology. Cambridge: Chapman & Hall.  
549 p.
- FRANKLAND, JC. 1998. Residential Address: Fungal succession-unraveling  
the unpredictable. *Mycol. Res.*, 102: 1-15.
- ENRÍQUEZ, S, DUARTE, C, SAND-JENSEN, K. 1993. Patterns in  
decomposition rates among photosynthetic organisms: the importance of  
detritus C:N:P content. *Oecologia*, no. 4: 457-471
- FOOTE, AL, REYNOLDS, KA. 1997. Decomposition of Saltmeadow Cordgrass  
(*Spartina patens*) in Louisiana Coastal Marshes. *Estuaries.*, 20 (3): 579-  
588.
- GESSNER, MO. 1997. Litter breakdown in rivers and streams. *Limnética*, 13:  
33-44.
- GESSNER, RV. 1980. Degradative enzyme production by salt-marsh fungi.  
*Bot. Mar.* 23:133-139.

- GESSNER, MO, CHAUVET, E. 1993. Ergosterol-to-Biomass Conversion Factory for Aquatic Hyphomycetes. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 502-507.
- GESSNER, MO, CHAUVET, E. 1994. Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf litter. *Ecology*, 75(6): 1807-1817.
- GESSNER, MO, VAN RYCKEGEM, G. 2003. Water fungi as decomposers in freshwater ecosystems. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology* (ed. G. Bitton). Wiley, New York (online edition: DOI: 10.1002/0471263397.env314).
- GESSNER, MO, CHAUVET, E, DOBSON, M. 1999. A perspective on leaf litter breakdown in streams. *Oikos.*, 85: 337-384.
- GULIS, V, SUBERKROPP, K. 2004. Effects of whole-stream nutrient enrichment on the concentration and abundance of aquatic hyphomycete conidia in transport. *Mycologia*, 96, 57–65.
- HALUPA, PJ, HOWES, BL. 1995. Effects of tidally mediated litter moisture content on decomposition of *Spartina alterniflora* and *Spartina patens*. *Mar. Biol.*, 123: 379–391.
- HERNÁNDEZ-VERA, E. 1982. Biota micótica de la zona supralitoral, entremareas y sublitoral de la costa norte y sur de Puerto Rico. Ph.D. Tesis, University of Puerto Rico, Mayag, R, Puerto Rico. 122 pp.
- HERNÁNDEZ-VERA, E, ALMODÓVAR, LR. 1983. *Gonyaulax tamarensis* Lebour (Pirrofita) y *Falkenbergia hillebrandii* (Barnet) Falkenberg (Rodofita), dos organismos con capacidades fungistades f de las costas de Puerto Rico. *Science-Ciencia.*, 10: 24-26.

- HICKENBICK, GR, FERRO, AL, ABREU, PC. 2004. Produção de detritos de macrófitas emergentes em uma marisma do estuário da Lagoa dos Patos: taxas de decomposição e dinâmica microbiana. *Atlântica.*, Rio Grande; 26: 61-75.
- IQBAL, SH, WEBSTER, J. 1973. Aquatic hyphomycete spora of the River Exe and its tributaries. *Transactions of the British Mycological Society*, 61, 331–46.
- JONES, EBG, SAKAYARO, J, SUETRONG, S, SOMRITHIPOL, S, PANG, KL. 2009. Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. *Fungal Diversity.*, 35, 1–187.
- KAUSHIK, NK, HYNES, HBN. 1968. Experimental study on the role of autumn shed leaves in aquatic environments. *J. Ecol.*, 56: 229-543.
- LYONS, JI, ALBER, M, HOLLIBAUGH, JT. 2010. Ascomycete fungal associated with early decaying leaves of *Spartina* spp. from central California estuaries. *Oecologia.*, 162: 435-442.
- LUO, J, YIN, JF, CAI, L, ZHANG, KQ, HYDE, KD. 2004. Freshwater fungi in Lake Dianchi, a heavily polluted lake in Yunnan, China. *Fungal Divers.*, 16: 93-112.
- LIAO, CZ, LUO, YQ, FANG, CM, CHEN, JK, LI, B. 2008. Litter pool sizes, decomposition, and nitrogen dynamics in *Spartina alterniflora*-invaded and native coastal marshlands of the Yangtze Estuary. *Oecologia.*, 156:589–600.
- MAZUCHELI, J, ACHCAR, J. 2002. Algumas considerações em regressão não linear. *Acta Scientiarum.*, 24, 6: 1761-1770.

- MARINS, JF, CARRENHO, R, THOMAZ, SM. 2009. Occurrence and coexistence of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate fungi in aquatic macrophytes in a tropical river–floodplain system. *Aquat. Bot.*, 91: 13–19.
- MENENDEZ, M, SANMARTI, N. 2007. Geratology and decomposition of *Spartina versicolor* in a brackish Mediterranean marsh. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 74, 320–330.
- METHVIN, BR, SUBERKROPP, K. 2003. Annual production of leaf-decaying fungi in streams. *J. North. Am. Benthol. Soc.*, 22, 554–64.
- MONTEMAYOR, D, ADDINO, M, FANJUL, E, ESCAPA, ALVAREZ, FM, BOTTO, F, IRIBARNE, OO. 2011. Effect of dominant *Spartina* species on salt marsh detritus production in SW Atlantic estuaries. *J. Sea Res.*, 66: 104–110.
- NEWELL, SY. 2001b. Spore-expulsion rates and extents of blade occupation by ascomycetes of the smooth-cordgrass standing decay system. *Bot. Mar.* 44:277-285
- NEWELL, SY. 2001a. Multiyear pattern of fungal biomass dynamics and productivity within naturally decaying smooth cordgrass shoots. *Limnol. Oceanogr.*, 46: 573-583.
- NEWELL, SY, PORTER, D. 2000. Microbial secondary production from saltmarsh- Grass shoots, and its known and potential fates. In: MP Weisstein, DA Kreeger (eds) *Concepts and Controversies in Tidal Marsh Ecology*. Kluwer Academic, Dordrecht, PP 149-185.

- NEWELL, SY, PORTER, D, LINGLE, WL. 1996. Lignocellulolysis by ascomycetes (fungi) of a salt marsh grass (smooth cordgrass). *Micro. Res. and Tech.*, 33:32-46.
- NEWELL, S. Y. 1993. Membrane-containing fungal mass and fungal specific growth rate in natural samples, p. 579–586. *In* P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr, and J. J. Cole [eds.], *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis.
- NEWELL, SY, STATZEL- TALLMAN, A. 1982. Factors for conversion of fungal biovolume values biomass, carbon and nitrogen: variation with mycelial ages, growth conditions, and strains of fungi from a salt marsh. *Oikos.*, 39: 261-268. Copenhagen
- NEWELL, SY. 2001. Multiyear patterns of fungal biomass dynamics and productivity within naturally decaying smooth cordgrass shoots. *Limnol. Oceanogr.*, 46:573–583.
- NEWELL, SY. 2003. Fungal content and activities in standing-decaying leaf blades of plants of the Georgia Coastal Ecosystems research area. *Aquat. Microb. Ecol.*, 32: 95–103.
- NEWELL, SY, PORTER, D. 2000. Microbial secondary production from saltmarsh grass shoots and its known potential fates, p. 159–185. *In* M. P. Wienstein and D. A. Kreeger (ed.), *Concepts and controversies in tidal marsh ecology*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands
- NIKOLCHEVA, LG, COCKSHUTT, AM, F. BÄRLOCHER. 2003. Determining diversity of freshwater fungi on decaying leaves: comparison of traditional and molecular approaches. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:2548–2554.

- NIKOLCHEVA, LG, BÄRLOCHER, F. 2004. Taxon-specific fungal primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream. *Mycol. Prog.*, 3 (1): 41–49.
- NUNES, MF, CUNHA-SANTINO, MB, BIANCHINI, I Jr. 2011. Xylanase and Cellulase Activities, During Anaerobic Decomposition of Three Aquatic Macrophytes. *Braz. J. Microbiol.*, 42: 75-83.
- PANITZ, CMN. 1992 - Ecological aspects of a salt marsh ecosystems in Santa Catarina Island, Brazil. In : *Coastal plant Communities of Latin America*. U. Seeliger (ed.), Academic Press. New York, p.213-230.
- PARK D (1972) Methods of detecting fungi in organic detritus in water. *Transactions of the British Mycological Society* 58: 281- 290.
- PEIXOTO, AR, COSTA, CSB. 2004. Produção líquida aérea de *Spartina alterniflora* Brong. (Poaceae) no estuário da laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Sér. Bot.* Porto Alegre., 59 (1): 27-34.
- PERAZZOLO, M, PINHEIRO, F. 1991. Aspectos anatômicos e adaptativos das partes vegetativas de *Spartina densiflora* Brong. (Graminea) da marisma do estuário da Lagoa dos Patos – RS. *Acta Bot. Bras.*, 5 (2): 3-16.
- PUTZKE, J, PUTZKE, MTL. 2002. O reino dos fungos. Volume 2. Editora Edunisc. Santa Cruz do Sul. 829p.
- RAJA, HA, SCHMIT, JP, SHEARER, CA. 2009. Latitudinal, habitat and substrate distribution patterns of freshwater ascomycetes in the Florida Peninsula. *Biodivers. Conserv.*, 18: 419-455.
- RAYNER, ADM, TODD, NK. 1979. Population and community structure and dynamics of fungi in decaying wood. *Adv. Bot. Res.*, 7: 333-420.

- REJMÁNKOVÁ, E, HOUDKOVÁ, K. Wetland plant decomposition under different nutrient conditions: what is more important, litter quality or site quality?. *Biogeochemistry*, v. 80, p. 245-262, 2006.
- RIDELL, R. W. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia.*, 42: 265-70.
- SANMARTÍ, N, MENÉNDEZ, M. 2007. Litter Decomposition of *Scirpus maritimus* L. in a Mediterranean Coastal Marsh: Importance of the Meiofauna during the Initial Phases of Detached Leaves Decomposition. *Internat. Rev. Hydrobiol.*, 92 ( 2): 211–226.
- SAMIAJI, J, BÄRLOCHER, F. 1996. Geratology and decomposition of *Spartina alterniflora* Loisel in a New Brunswick saltmarsh. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 201: 233–252.
- SHEARER, CA, DESCALS, E, KOHLMAYER, B, KOHLMAYER, J, MARVANOVÁ, L, PADGET, D, PORTER, D, RAJA, HA, SCHMIDT, JP, THORNTON, HA, VOGLYMAYR, H. 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation.*, 16, 49–67.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, IH, MILANEZ, AI. 1989. Sucessão fúngica em folhas de *Ficus microcarpa* L. f. submersas no lago frontal situado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, *Rev. Microbiol.*, 20(1): 95-101.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, IH, PIRES-ZOTARELLI, CLA, MILANEZ, A. 1998. Fungal succession on leaves of *Alchornea triplinervia* (Spreng.) Muell. Arg. submerged in a stream of an Atlantic Rainforest in the State of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, 21(3): 253-259.

- SCHOENLEIN-CRUSIUS, IH, MOREIRA, CG, BICUDO, DC. 2009. Aquatic Hyphomycetes in the Parque Estadual das Fontes do Ipiranga – PEFI, São Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Bot.* ,32: 411-426.
- SEELIGER, U, ODEBRECHT, C, CASTELO, JP. 1998. Os Ecosistemas Costeiros e Marinho do Extremos Sul Do Brasil. Rio Grande, RS. Ed. Ecoscientia. 341p.
- SHOUN, H, KIM, DH, UCHIYAMA, H, SUGIYAMA, J. 1992. Denitrification by fungi. *FEMS Microbiol. Lett.*, 94, 277–81.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, IH, PIRES-ZOTARELLI, CLA, MILANEZ, AI. 2004. Amostragem em Limnologia: Os fungos Aquáticos. *In*: Bicudo, C. E. M.; Bicudo, D. C. Amostragem em Limnologia. 2. Ed. Rima Editora. São Carlos, p. 179-191.
- SUBERKROPP, K, GODSHALK, GL, KLUG, MJ. 1976. Changes in the chemical composition of leaves during processing in a woodland stream. *Ecology*, 57, 720–77. TEM QUE POR COMO ET AL NO TEXTO, TA COM KLUG
- SUBERKROPP, K, WEYERS, H. 1996. Application of fungal and bacterial production methodologies to decomposing leaves in streams. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1610–15.
- VYMAZAL, J. 1995. *Algae and Element Cycling in Wetlands*. Boca Raton: Lewis Publishers.
- VAN RYCKEGEM, G, VERBEKEN, A. 2005. Fungal ecology and succession on *Phragmites australis* in a brackish tidal marsh. I. Leaf sheaths. *Fungal Divers.*, 19: 157-187.

- VAN RYCKEGEM, G, VERBEKEN, A. 2005. Fungal ecology and succession on *Phragmites australis* in a brackish tidal marsh. II. Stems. *Fungal Divers.*, 20: 209-233.
- VIJAYKRISHNA, D, JEEWON, R, HYDE, KD. 2006. Molecular taxonomy, origins and evolution of freshwater ascomycetes. *Fungal Divers.*, 23: 351–390.
- WALLNER-KERSANACH, M, RIBEIRO, ARL, MACHADO, EC. 2010. Análise Instrumental – Analisador Elementar CHNS/O. In: BAUMGARTEN, MGZ, WALLNER-KERSANACH, M, NIENCHESKI, LHF. Manual de Análises em Oceanografia Química. Editora da Furg, pp. 145-166.
- WEBSTER, JR, BENFIELD, EF. 1986. Vascular Plant Breakdown in Freshwater Ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 567-594.
- WETZEL, RG & GE LIKENS 1991. *Limnological analyses* (2o ed.), Springer - Verlag, New York. 391p.
- WITKAMP, M, VAN DRIFT, J. 1961. Breakdown of forest litter in relation to environmental factors. *Plant Soil.*, 15(4): 595-311.
- ZAR, JH. 1996. Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey.

## **DISCUSSÃO GERAL**

### **VARIAÇÃO ESPACIAL E TEMPORAL DE FUNGOS NO ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS**

O conhecimento da diversidade dos fungos em ambientes aquáticos e marinhos ainda é escasso, considerando sua importância nestes ecossistemas. Os fungos exercem o importante papel como decompositores e participantes da ciclagem de nutrientes. Os fungos contribuem para o fluxo de energia e produtividade de diferentes ecossistemas ao fornecer carbono orgânico, na forma de detrito, para organismos de níveis tróficos superiores (Hyde *et al.* 1998).

No estuário da Lagoa dos Patos, a distribuição espacial e temporal de fungos no período de 2007 a 2008 foi afetada principalmente pelos fatores salinidade, concentrações de amônia e fosfato e das leveduras pela salinidade. E no período de junho de 2009 à junho de 2010, os fatores que mais afetaram a distribuição de fungos neste estuário foram salinidade, temperatura, concentração de nitrito+nitrato e fosfato, e as leveduras pelos nutrientes nitrito+nitrato e pH. Desta forma, pode-se dizer que a salinidade é o fator que constantemente afeta a distribuição destes organismos na água deste estuário, como sugerido em nossa hipótese de trabalho.

Esta hipótese ainda é corroborada pelo fato de que a diversidade de fungos das amostras de água observada nos períodos de março de 2007 à junho de 2008 (período 1) e junho de 2009 à junho de 2010 (período 2) foi diferente provavelmente devido diferenças de a salinidade, mas também

outras variáveis abióticas, que apresentaram diferenças significativas entre os dois períodos.

De maneira geral os dois períodos mostraram marcada diferença de salinidade, com valores maiores entre março de 2007 e junho de 2008, especialmente no local Museu (Tabela 1). No segundo período de amostragem, as águas com menores salinidades também se caracterizaram por maiores concentrações de elementos nitrogenados (Tabela1).

Tabela 1. Variação dos valores das variáveis abióticas analisadas nos períodos I (2007 -2008) e II (2009 – 2010).

		Praia				Barra				Museu				Geral	
		Média	DP	Mín	Máx	Média	DP	Mín	Máx	Média	DP	Mín	Máx	Média	DP
Período I (07-08)	Sal	29,56	4,16	21	35	17,12	12,1	1	34	13,37	9,46	1	31	20,02	11,37
	Temp. Água	18,09	5,42	6	25	18,75	5,29	9	25	18,78	5,07	10	25	18,54	5,16
	Ph	7,8	0,1	7,6	8,2	7,7	0,3	7	8,3	7,7	0,3	7,2	8,3	7,7	0,29
	Secchi	18,12	14,8	5	60	67,81	59,8	5	200	58,75	61,4	5	200	48,22	53,76
	Amônia	5,29	7,14	0,5	30,2	7,86	15	1,2	62,5	6,93	10,9	0,7	45,1	6,69	11,28
	Nit+Nitrat	2,94	3,45	0,1	14,3	8,43	13	0,1	39,8	5,72	9,7	0,1	40,4	5,69	9,65
	Fosfato	1,03	0,42	0,5	1,88	1,38	0,76	0,4	3,16	1,13	0,71	0	3,16	1,18	0,65
Período II (09-10)	Sal	28,15	2,15	24	30	12	10,7	0	30	7,53	7,24	0	24	15,89	11,6
	Temp. Água	18,76	4,74	13	28	19,76	5,3	13	28	19,3	5,4	12	28	19,28	5,04
	pH	8,03	0,12	7,9	8,4	7,97	0,2	7,6	8,5	7,84	0,18	7,6	8,2	7,95	0,19
	Secchi	15,38	11,6	5	40	46,15	31,2	10	120	74,3	79,8	1	200	45,28	55,31
	Amônia	16,77	14,1	0,1	38,7	30,12	31,8	1	85,9	32,15	31	3,4	81,5	26,35	27,05
	Nit+Nitrat	4,36	1,92	2,2	8,58	13,14	11,4	2,4	33,6	9,18	5,81	3,5	21,1	8,89	8,14
	Fosfato	0,85	0,45	0,3	1,43	1,24	0,81	0,2	2,73	1,36	0,91	0,3	2,89	1,15	0,76

Período 2007-2008 e 2009-2010

Os menores valores de salinidade observados no período 2009-2010 podem ter propiciado uma maior diversidade e número de isolados de fungos

por uma maior contribuição de espécies límnicas, que conseguiam sobreviver no estuário devido a menor salinidade durante a maior parte do estudo. A salinidade foi sido referenciada como um fator limitante de crescimento de fungos (Mueller *et al.* 2004). E até mesmo fungos de ambientes marinhos podem ter seu crescimento influenciado pela salinidade (Tarman *et al.* 2011).

Por outro lado, os maiores valores de nutrientes nitrogenados (amônia, nitrito e nitrato) medidos em águas com baixa salinidade no segundo período também pode também ter contribuído para a maior número de gêneros encontrados neste período. A presença de nutrientes nitrogenados propicia um maior crescimento nos fungos, que podem obter estes elementos do substrato em decomposição, mas também da água onde se encontram (Caddick *et al.* 1994, Marzluf, 1997). Desta forma, a presença de maior quantidade de isolados no período 2009-2010 também poderia estar relacionada a uma maior absorção de amônia e nitrito+nitrato por estes microrganismos.

Os gêneros comuns aos dois períodos foram *Aspergillus* , *Bispora* , *Botryoderma* , *Cladosporium* , *Botryoderma* , *Penicillium* , *Trichoderma* , *Trichophyton* Os gêneros *Alternaria* , *Aureobasidium* , *Botryotrichum* , *Chrysosporium* , *Helminthosporium* , *Monosporium* , *Mucor* , e *Papulospora* , estiveram presentes somente no período 2007 - 2008) enquanto os gêneros *Paecilomyces* , *Phialophora* , *Scopulariopsis* , *Speirospsis* , e *Tilletiopsis* , somente no período 2009- 2010.

Para os fungos que foram característicos apenas do período 2007- 2008 podemos supor que estes gêneros sofrem maior influência marinha, sendo mais tolerantes aos maiores níveis de salinidade. Entretanto, são necessários estudos para a identificação em nível de espécie, utilizando-se técnicas de

biologia molecular, como por exemplo, sequenciamento de regiões ITS e dos domínios D1/D2 do rRNA gene para os fungos filamentosos (Loque *et al.* 2010).

Para os gêneros característicos do período 2009 - 2010, é muito provável que as espécies que serão identificadas pertençam a ambientes límnicos, que encontraram baixa salinidade e maior disponibilidade de compostos nitrogenados no estuário, caracterizando um ambiente ideal para seu desenvolvimento.

## **INTERAÇÃO ENTRE OS FUNGOS DO MARISMA E DA COLUNA DE ÁGUA DO ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS E REGIÃO COSTEIRA ADJACENTE**

Os fungos isolados das amostras de água do estuário da Lagoa dos Patos e Praia do Cassino comparados com aqueles isolados das amostras dos “litter-bags” das macrófitas *Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora* e *Scirpus maritimus* apresentaram composições distintas. Este fato é uma forte indicação de que não há uma transferência direta dos fungos de marisma para a coluna de água por lixiviação ou transporte de partículas. Isto talvez se deva a diferença de disponibilidade do substrato nos dois ambientes, pois estudos têm mostrado que o tipo de substrato é importante na distribuição de ascomicetos (maioria de nossos isolados) em água doce (Luo *et al.* 2004, Cai *et al.* 2003). Sendo assim, os gêneros que colonizam as macrófitas em decomposição neste estudo se beneficiaram das condições de aderência e estabilidade no substrato.

E isolados das amostras de água ficam restritos a matéria orgânica particulada em suspensão de pequeno tamanho presente na coluna de água.

Vários autores relatam que os diferentes estágios da matéria vegetal que se tornam disponíveis para a colonização de fungos, da primeira fase de decaimento até etapas mais avançadas de decomposição, são caracterizados por uma micota diferente do meio circundante (Apinis *et al.* 1972a, b, 1975;. Luo *et al.* 2004;. Van Ryckegem & Verbeken, 2005 a, b). Porém Raja *et al.* (2009) ressaltam que, além do substrato, é necessário o conhecimento dos fatores ambientais que podem determinar o padrão de distribuição, para avaliar com precisão a diversidade de fungos.

Por outro lado, verificou-se que os isolados obtidos neste estudo, tanto das amostras de água, como de macrófitas são, na sua maioria, pertencentes ao filo Ascomycota. E este grupo geralmente predomina em ambientes aquáticos (Shearer *et al.* 2007), marinhos (Shearer *et al.* 2007, Jones *et al.* 2009, Hyde *et al.* 2000) e locais com muita matéria orgânica em decomposição (Nikolcheva & Bärlocher , 2004, Pearman *et al.* 2010).

## **SUCESSÃO DE GÊNEROS DE FUNGO DURANTE A DECOMPOSIÇÃO DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS NO ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS**

Padrões de sucessão de fungos nem sempre são facilmente estabelecidos, pois existem muitos fatores que influenciam a diversidade e colonização destes organismos em um substrato. Na maioria dos estudos, os resultados se baseiam, principalmente, na capacidade de esporulação dos fungos e desconsideram interações com outros organismos. Também o uso de técnicas que talvez não contemplem todos os fungos que possam estar presentes no substrato nos experimentos, possa ser uma deficiência nos trabalhos conduzidos com sucessão fúngica em plantas em decomposição.

Atualmente as técnicas moleculares parecem estar contornando o problema de fungos não cultiváveis e tornaram-se uma ferramenta poderosa para a identificação de espécies que não esporulam (Giordano *et al.* 2009, Promputtha *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005).

Alguns exemplos de sucessão de fungos já são bem conhecidos, como observada em decomposição de vegetação de mangue, onde alguns padrões já tem sido estabelecidos. Por exemplo, estudos de sucessão em *Halophytophthora*, mostram que durante os estágios iniciais de decomposição, traustequitrídios e fungos terrestres podem colonizar este substrato. No segundo estágio de decomposição, ocorrem espécies terrestres e fungos marinhos facultativos e nos estágios finais aparecem fungos marinhos obrigatórios e novamente fungos terrestres (Newell, 1976; Fell and Newell, 1981, Raghukumar *et al.* (1994).

No presente estudo, os gêneros de fungos isolados das amostras provenientes das três espécies de macrófitas foram distintos entre si não sendo, por isso, possível se caracterizar um padrão de sucessão comum às três espécies. Na verdade, a distribuição distinta de gêneros de fungos observados entre as t espécies de plantas e em diferentes períodos de observação pode ter se dado devido à constituição química e morfológica de cada espécie de planta estudada. Além disto, a presença durante o processo de decomposição de outros microrganismos que não foram avaliados neste estudo, como por exemplo, bactérias, podem ter influenciado esta distribuição. Segundo Van Ryckegem *et al.* (2005), variações na composição de espécies de fungos na decomposição de macrófitas podem ocorrer em diferentes

regiões na mesma planta. Podemos ainda considerar a presença de fungos que não foram identificados pela metodologia utilizada.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Os resultados desta tese mostram que existe uma considerável diversidade de fungos no estuário da Lagoa dos Patos, ocupando diferentes nichos e participando do processo de formação de detritos neste ecossistema. Entretanto, são necessários estudos para se poder aprofundar e detalhar a participação destes organismos na ecologia deste ecossistema. Entre os estudos necessários destacamos:

- Identificação em nível de espécies dos isolados fúngicos;
- Utilizar medidas de biomassa fúngica;
- Avaliar a atividade enzimática dos fungos e leveduras isolados;
- Avaliar as relações entre fungos e bactérias no estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente;
- Avaliar a presença de fungos não cultiváveis no estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente.

## **REFERÊNCIAS**

- ABD-ELAAHI, GA. 1998. The occurrence of fungi along the Red Sea coast and variability among isolates of *Fusarium* as revealed by isozyme analysis. *J Basic Microbiol* ; 38: 303–311.
- APINIS, AE, CHESTERS, CGC, TALIGoola, HK. 1972a. Colonisation of *Phragmites communis* leaves by fungi. *Nova Hedwigia.*, 23: 113-124.

- APINIS, AE, CHESTERS, CGC, TALIGOOOLA, HK. 1972b. Microfungi colonizing submerged standing culms of *Phragmites communis Trin. Nova Hedwigia.*, 23: 473-480.
- CAI, L, ZHANG, K, MCKENZIE EHC, HYDE, KD. 2003. Freshwater fungi from bamboo and wood submerged in the Liput river in the Philippines. *Fungal Divers.*, 13:1–12.
- FELL, JW, NEWELL, SY. 1981. Role of fungi in carbon flow and nitrogen immobilization in coastal marine plant litter systems. In: Wicklow, D.T., Carroll. G.C. (Eds.), *The fungal community: its organization and role in the ecosystem.* Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 665-678.
- GEISER, DM, TAYLOR, IW, RITCHIEI, KB, SMITH, GW. 1998. Cause of sea fan death in the West Indies. *Nature.*, 394: 137-138.
- GIORDANO, L, GONTHIER, P, VARESE, GC, MISERERE, L, NICOLOTTI, G 2009. Mycobiota inhabiting sapwood of healthy and declining Scots pine (*Pinus sylvestris L.*) trees in the Alps. *Fungal Divers.*, 38: 69-83.
- HYDE, KD, SARMA, VV, JONES, EBG. 2000. Morphology and taxonomy of higher marine fungi. In: *Marine Mycology – A Practical Approach* (eds KD Hyde, SB Pointing). *Fungal Diversity Research Series 1*, 172–204.
- JONES, EBG, SAKAYARO, J, SUETRON, S, SOMRITHIPO, S, PANG, KL. 2009. Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. *Fungal Divers.*, 35, 1–187.
- LAURENCE, M, LOPEZ, JF, GUNDE-CIMERMAN, N, GRIMAL. 2000. Sterols of melanised fungi from hypersaline environments. *Organic Geochemistry.*, 31: 1031-1040.

- LOQUE, CP, MEDEIROS, AO, PELIZZARI, FM, OLIVEIRA, EC. ROSA, CA, ROSA, LH. 2010. Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica Polar. *Biol.*, 33:641–648.
- LUO, J, YIN, J, CAI, L, ZHANG, K, HYDE, KD. 2004. Freshwater fungi in Lake Dianchi, a heavily polluted lake in Yunnan, China. *Fungal Divers.*, 16:93–112.
- NEWELL, SY. 1976. Mangrove fungi: the succession in the mycoflora of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) seedlings. In: Jones, E.B.G. (Ed.), Recent advances in aquatic mycology. Elek Science, London, pp. 51- 91.
- NIKOLCHEVA, LG, BÄRLOCHER, F. 2004. Taxon-specific fungal primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream. *Mycol., Prog.* 3:41–49.
- PIVKINI, MV. 2000. Filamentous fungi associated with holothurians from the sea of Japan, off the Primorye Coast of Russia. *Biol. Bull.*,198: 101-109.
- PROMPUTTHA, L, JEEWON, R, LUMYONG, S, MCKENZIE, EHC, HYDE, KD. 2005. Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of non sporulating endophytes from *Magnolia liliifera* (Magnoliaceae). *Fungal Divers*, 20: 167-186.
- RAGHUKUMAR, S, SHARMA, S, RAGHUKUMAR, C, SATHE-PATHAK, V. 1994. Thrausochytrid and fungal component of detritus. IV. Laboratory studies on decomposition of leaves of the mangrove *Rhizophora apiculata* Blume. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*,183: 113-131.
- RAJA, HA, SCHMIT, JP, SHEARER, CA. 2009. Latitudinal, habitat and substrate distribution patterns of freshwater ascomycetes in the Florida Peninsula. *Biodivers. Conserv.*, 18: 419-455.

- SHAUMANN, K. 1993. Marine pilze. In *Mikrobiologie des meeresbodens*. Meyer-Reil LA und Köster M. Gustav Fisher, 144–195.
- SHEARER, CA, DESCAL, E, KOHLMAYER, B, KOHLMAYER, J, ARVANNOVA, L, PADGET, D, PORTER, D, RAJA, HA, SCHIMDT, JP, THORNTON, HA, VOGGLYMAYR, H. 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodivers. Conserv.*, 16, 49–67.
- VAN RYCKEGEM, G, VERBEKEN, A. 2005 a. Fungal diversity and community structure on *Phragmites australis* (Poaceae) along a salinity gradient in the Scheldt estuary (Belgium). *Nova Hedwigia.*, 80: 173-197.
- VAN RYCKEGEM, G, VERBEKEN, A. 2005b. Fungal ecology and succession on *Phragmites australis* in a brackish tidal marsh. I. Leaf sheaths. *Fungal Divers.*, 19: 157-187.
- WANG, H, HYDE, KD, SOYTONG, K, LIN, FC. 2008. Fungal diversity on fallen leaves of *Ficus* in northern Thailand. *J. Zhejiang University SCI.*, 9: 835-841.