

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Instituto de Oceanografia - IO
Programa de Pós Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica –
PPGOFQG

Tapetes Microbianos da Lagoa dos Patos (RS – Brasil): Ocorrência, Fatores Meteorológicos Relacionados e Fixação de Nitrogênio

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica do Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Oceanografia Física, Química e Geológica.

Pablo Santos Guimarães

Rio Grande, 16 de outubro de 2015

Orientador:

Prof.º Dr. João Sarkis Yunes

Instituto de Oceanografia

Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Co-orientador:

Prof.º Dr. Lucas J. Stal

Yerseke Marine Microbiology

Royal Netherlands Institute for Sea Research

Índice

Agradecimentos	6
Resumo	7
Abstract.....	8
Lista de Figuras	9
Lista de Figuras	16
Capítulo 1: Revisão Bibliográfica	17
1. Tapetes Microbianos	17
2. Formação dos Tapetes Microbianos.....	20
2.1. A Colonização do Sedimento	20
3. Estrutura dos Tapetes Microbianos	27
4. Organismos formadores de Tapetes	29
5. Fatores Físicos, químicos e biológicos.....	32
5.1. Modificadores Laterais (tempo e espaço)	34
5.1.1. Hidrodinâmica.....	34
5.1.2. Dessecação	34
5.1.3. Temperatura	35
5.1.4. Salinidade.....	36
5.2. Controle <i>Top-down</i>	37
5.2.1. Influência dos Predadores	37
5.3. Controle <i>Bottom-up</i>	38
5.3.1. Disponibilidade de Luz	38
5.3.2. Nutrientes	41
6. Delineamento da Tese de Doutorado	44
Capítulo 2: Tapetes Microbianos da Lagoa dos Patos: primeira ocorrência, composição e estruturas erosionais.....	47
1. Introdução	47
2. Materiais e Métodos.....	50

2.1.	Amostragem e Análises de Campo	51
2.2.	Análises de Laboratório	53
2.2.1.	Composição da comunidade por Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	53
2.2.2.	Análises do Teor de Clorofila- <i>a</i> , Proteína e Carboidrato	55
2.2.3.	Granulometria.....	56
2.2.4.	Análise Molecular	56
2.2.5.	Análise Estatística	57
3.	Resultados	57
4.	Discussão.....	73
5.	Conclusão.....	77
Capítulo 3: Tapetes Microbianos da Lagoa dos Patos (RS – Brasil): Sazonalidade e importância de fatores meteorológicos.....		78
1.	Introdução	78
2.	Material e Métodos.....	80
2.1.	Amostragem e Análises de campo	80
2.2.	Análises de Laboratório	82
2.2.1.	Composição da comunidade de Tapete	82
2.2.2.	Dados Meteorológicos.....	83
2.2.3.	Análise Estatística	83
3.	Resultados	84
4.	Discussão.....	88
Capítulo 4: Efeito da Aclimação e Estresse Salino em <i>Anabaena</i> sp. isolada de um Tapete Microbiano Estuarino		94
1.	Introdução	94
	Métodos para medir Fixação de Nitrogênio	96
2.	Material e Métodos.....	97
2.1.	Microorganismo Experimental.....	97
2.2.	Experimento 1	98
2.3.	Experimento 2	99
2.4.	Análises	101
2.4.1.	Contagem Celular.....	101
2.4.2.	Análise da Redução do Acetileno (ARA)	102

2.4.3.	Teor de Clorofila- <i>a</i>	103
2.4.4.	Análise de Carbono e Nitrogênio Total.....	103
3.	Resultados	104
3.1.	Experimento 1	104
3.2.	Experimento 2	105
4.	Discussão.....	111
4.1.	Experimento 1	111
4.2.	Experimento 2	112
5.	Conclusão.....	118
	Considerações Finais	119
	Referências Bibliográficas.....	121

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que foram como faróis em meu caminho:

- Ao Prof. Dr. João Sarkis Yunes, pela orientação, pela confiança depositada em mim desde a graduação e pelo incentivo no Doutorado Sanduíche;
- Ao Prof. Dr. Lucas J. Stal pela orientação e apoio no NIOZ (Yerseke – Holanda);
- Ao CNPq por financiar este trabalho com uma bolsa e a CAPES pela bolsa PDSE;
- A todos os amigos do NIOZ, que ajudaram não apenas em experimentos, mas no convívio durante os 6 meses que estive em Yerseke;
- Ao Povo da UPC, Andreza, Edi, Felipe, Juliana, Juliane, Lucas, Luis, Luiza, Mariana e Nathália, companheiros de trabalho e descontração;
- Aos professores e técnicos da Botânica (FURG) e aos alunos de Ciências Biológicas, com os quais aprendi e descobri o prazer da docência;
- Aos meus amigos Angelina, Anselmo, Laís, Marcelo, Lorena, Daniel, Mitchel, Stephanie, Silvana, Vinícius, Mauro e Cibele, cujo convívio nem sempre foi possível ao longo dos 4 anos, seja pela distância ou pela falta de tempo, mas que foram fundamentais nesta jornada;
- À minha segunda Família, Manoel, Eliane, Renan, Eduarda e Leandro, obrigado pelo apoio, carinho e compreensão;
- À minha Família, André, Fátima, Pedro, Tamara e Elisa, berço dos meus valores morais, minha referência na vida e profissão;
- Aos meus afilhados Clara e Biel e minha sobrinha Malu, que me ensinam o valor de conquistar um simples sorriso;
- À minha esposa Cíntia, pelo amor, amizade e confiança. Obrigado por dividir comigo as angústias e conquistas. Te amo!

“Faróis iluminam a escuridão dos mares, dia e noite, sem cessar. São luzes solitárias e não esmorecem, atuando principalmente nos dias difíceis de grandes tempestades.”

“Seres Faróis” - Maria Cristina Tanajura

Resumo

Guimarães, Pablo Santos. **Tapetes Microbianos da Lagoa dos Patos (RS – Brasil): Ocorrência, Fatores Meteorológicos Relacionados e Fixação de Nitrogênio.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande, 2015

Nas últimas décadas comunidades de tapetes microbianos têm sido descritas nos mais diversos ambientes do hemisfério Norte, enquanto que a escassez de relatos para a América do Sul reflete a falta de estudos e grupos dedicados à este tipo de comunidade. O presente trabalho objetiva (1) descrever comunidades de tapetes do estuário da Lagoa dos Patos (RS – Brasil) de acordo com seu local de ocorrência na zona intermareal, composição e estrutura, bem como o efeito de forçantes físicas na erosão destes; (2) relacionar a ocorrência e composição de tapetes microbianos na Lagoa dos Patos com fatores meteorológicos importantes na hidrodinâmica do estuário e (3) estudar o estresse e aclimação às diferentes salinidades por *Anabaena* sp., uma cepa de cianobactéria heterocitada isolada de tapetes microbianos do estuário da Lagoa dos Patos. Na Lagoa dos Patos os tapetes microbianos ocorreram nas zonas supra e meso intermareal e apresentaram dominância principalmente de cianobactérias filamentosas heterocitadas ou não, e diatomáceas penadas. Na zona intermareal superior os tapetes ficam menos expostos a erosão, e frequentemente associados às fanerógamas, possibilitando a ocorrência de comunidades mais complexas, estáveis e com maior teor de clorofila e proteína. Na zona intermareal mediana a comunidade de tapete fica exposta à forçantes físicas que aumentam a erosão, evidenciada pela observação das estruturas sedimentares induzidas por microorganismos e devido à maior influência espacial e temporal de água doce, apresentou maior abundância relativa de espécies de cianobactérias heterocitadas. Os tapetes ocorrem associados às condições que favorecem a maior umidade no sedimento, especialmente para aqueles tapetes que ocorrem na zona intermareal superior, e às condições em que a direção e intensidade do vento não levam à erosão da margem colonizada, para tapetes que ocorrem na zona intermareal mediana. Nossos experimentos com *Anabaena* sp. mostraram que a cepa está mais adaptada ao meio com alta salinidade. Mesmo com contagens menores de heterocitos, em alta salinidade a cepa apresentou atividade nitrogenase similar.

Palavras-chave: tapetes microbianos; zona intermareal; condições meteorológicas; atividade nitrogenase.

Abstract

Guimarães, Pablo Santos. **Microbial mats from Lagoa dos Patos (RS - Brazil): Occurrence, Related Meteorological Factors and Nitrogen Fixation.** Doctoral Thesis, Federal University of Rio Grande, 2015

In recent decades microbial mats have been described in many different environments of the Northern hemisphere, while the scarcity of reports to South America reflects the lack of studies and groups dedicated to this type of community. Our aims are (1) describe the microbial mats from Lagoa dos Patos (RS – Brazil) according to place of occurrence on the intertidal zone, composition and structure, and the effect of physical forcing that led to the erosion; (2) correlate the occurrence of microbial mats from Lagoa dos Patos with meteorological factors, which are important to the estuarine hydrodynamics; (3) study stress and acclimatation of *Anabaena* sp., which was isolated from microbial mats from Lagoa dos Patos, to different salinities. The microbial mats occurred on the supra and mesotidal zone. Filamentous cyanobacteria (heterocited or not) and pinnate diatoms were the mainly dominant taxons. On the supratidal zone the microbial mats were less exposed to the erosion and were often associated to phanerogams, which allowed achieve more complex communities with highest chlorophyll a and protein content. On the mesotidal zone the community was more exposed to the erosion, evidenced by the presence of Microbially Induced Sedimentary Structures (MISS), and due the highest influence of freshwater they were also composed by a highest percentage of heterocited cyanobacteria. The microbial mats on the supratidal zone occurred associated to conditions that allowed highest sediment humidity whereas the mesotidal microbial mat were associated to wind conditions that did not led to erosion. Our experiments with *Anabaena* sp. showed that this strain still adapted to high salinity. Even with a lower heterocites counting, under highest salinity the strain showed similar nitrogenase activity.

Key-words: microbial mats; intertidal zone; meteorological factors; nitrogenase activity.

Lista de Figuras

Capítulo 1: Revisão Bibliográfica

Figura 1. Diagrama de Hjulström e a relação entre velocidade de fluxo e tamanho do sedimento na erosão, transporte e sedimentação (Nichols, 2009).....**21**

Figura 2. Formação de um biofilme em cinco estágios. Estágio (1) células se aderem a superfície sedimentar; (2) produção e liberação de EPS resulta em uma maior adesão irreversível ao substrato; (3) desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme ou tapete microbiano; (4) maturação da estrutura de biofilme e formação de estrutura multilaminar em tapetes microbianos; (5) dispersão de células livres ou fragmentos do biofilme e tapete microbiano (Adaptado de Stoodley *et al.*, 2002).....**23**

Figura 3. Bioestabilização do sedimento por cianobactérias bênticas. Bioestabilização do Tipo I (BSI) ocorre em função do efeito de fixação do sedimento por EPS e da coesa rede de feixes de filamentos espessos do tapete microbianos epibentônico. Bioestabilização do Tipo II (BSII) ocorre em função do efeito da fixação do sedimento por tricomas simples que entrelaçam as partículas da superfície do sedimento (tapete microbiano endobentônico). Bioestabilização do Tipo III (BSIII) ocorre em função de biofilmes que envelopam os grãos de sedimento formando agregados biótico-minerais. Estes agregados flutuam facilmente e permanecem em suspensão até serem depositados na superfície intermareal (adaptado de Noffke 2010).....**25**

Figura 4. Classificação das Estruturas Sedimentares Induzidas por Microrganismos (MISS). O diagrama mostra a relação de formação de todos os MISS. As estruturas são induzidas por crescimento, bioestabilização, abafamento,

aprisionamento, ou coesão. O centro do diagrama inclui MISS formadas pela interferência de todas as interações físico-bióticas (Noffke 2010).....27

Figura 5. Modelo conceitual do papel do estresse físico operando lateralmente em todos os níveis tróficos (setas laterais), das forçantes “*bottom-up*” (fatores limitantes físico químicos - setas superiores) e “*top-down*” (predação e pastejo – setas inferiores) na regulação da estrutura da comunidade de tapete. Adaptado de Thompson et al. (2004).....33

Capítulo 2: Tapetes Microbianos da Lagoa dos Patos: primeira ocorrência, composição e estruturas erosionais

Figura 1. Mapa do Estuário da Lagoa dos Patos (RS-Brasil), com a localização dos pontos de coleta e da estação meteorológica. A, B, C e D: pontos e área de coleta. Escala = 5 km.....50

Figura 2. Distribuição dos tapetes microbianos na zona intermareal da Lagoa dos Patos (RS – Brasil). Adaptado de Abed *et al.* (2010).....58

Figura 3. Granulometria dos pontos de coleta A (n=11), B (n=11) e C (n=11) na Lagoa dos Patos (RS – Brasil) entre Novembro de 2012 e Julho de 2014.....59

Figura 4. Detalhe da superfície do sedimento colonizado por um tapete microbiano (A); Microscopia eletrônica de varredura da comunidade de tapete aderida a um grão de sedimento (B). Tipos de tapetes encontrados na Lagoa dos Patos: associado ao sedimento na zona intermareal mediana (C), associado às fanerógamas (D) e ao afloramento de água subterrânea (E) na zona intermareal superior. Estruturas sedimentares induzidas por microorganismos (MISS) observadas em tapetes da Lagoa dos patos: superfície deposicional nivelada fragmentada por bolsões de erosão (F),

fragmentos de tapete microbiano flutuando após evento de erosão (G), remanescentes erosionais (H) e superfície marcada por pequenas cavidades formadas por bolhas fotossintéticas.....61

Figura 5. Abundância Relativa das cinco principais táxons e de seus grupos morfofuncionais nos tapetes microbianos associados ao sedimento na região intermareal mediana (Sand; n=12), a vegetação rasteira de margem (Grass n=13) e ao afloramento de água subterrânea (Groundwater; n=3) na zona intermareal superior do estuário da Lagoa dos Patos (RS – Brasil) de acordo com a abordagem Filogenética (A) e de Grupos Morfo-Funcionais (B). flagelados mixotróficos unicelulares (UMF); flagelados autotróficos coloniais (CAF); cianobactérias filamentosas (FCY), heterocitadas (HCY) e coloniais (CCY); diatomáceas cêntricas (CDI) e penadas (PDI); algas verdes cocóides e unicelulares (GCU); algas verdes coloniais ou cenobiais (GCC); e algas verdes filamentosas (GFI).....67

Figura 6. Densidade celular (A), Índices de dominância (B), Shannon (C) e Número de táxons da camada superficial (5mm) dos tapetes microbianos associados ao sedimento na zona intermareal mediana (Sand; n=15) e a vegetação na zona intermareal superior (Grass; n=5) sedimento no estuário da Lagoa dos Patos (RS - Brasil) de Janeiro a Julho de 2014.....68

Figura 7. Riqueza (A), abundância relativa de espécies (B) e análise de similaridade (C) de tapetes microbianos coletados em janeiro de 2014 no estuário da Lagoa dos Patos (RS-Brasil).70

Figura 8. Análise do teor de clorofila *a*, proteína e carboidratos em três diferentes camadas dos tapetes microbianos do Estuário da Lagoa dos Patos (RS – Brasil) associados ao sedimento na zona mesomareal (sand; n=15), associados à fanerógamas na zona supramareal (Grass; n=5) e do sedimento não colonizado pela comunidade de

tapete (No Mate; n=6). L1: camada superior entre 0 e 0,5 cm; L2: camada intermediária entre 0,5 e 1 cm; L3: camada inferior entre 1 e 1,5 cm. ANOVA com teste de Kruskal-Wallis (letra maiúscula para comparação entre tipos de tapete e letra minúscula para comparação entre camadas; $p < 0,05$)71

Figura 9. Análise DGGE para genes 16S de amostras de tapetes microbianos coletadas durante o verão de 2014 na Lagoa dos Patos (Brasil – RS). MI: tapetes da zona mesomareal; UI: tapetes da zona supramareal.....72

Figura 10. Análise DGGE para genes nifH de amostras de tapetes microbianos coletadas durante o verão de 2014 na Lagoa dos Patos (Brasil – RS). MI: tapetes da zona mesomareal; UI: tapetes da zona supramareal.....72

Capítulo 3: Tapetes Microbianos da Lagoa dos Patos (RS – Brasil):

Sazonalidade e importância de fatores meteorológicos

Figura 1. Mapa do Estuário da Lagoa dos Patos (RS-Brasil), com a localização dos pontos de coleta e da estação meteorológica. Escala 5km.....81

Figura 2. Análise dos Componentes Principais (PCA) da ocorrência de tapetes microbianos na zona intermareal mediana, intensidade do vento, precipitação total, temperatura do ar, salinidade e nível da água no Estuário da Lagoa dos Patos (RS – Brasil) entre Novembro de 2011 e Dezembro de 2012. Ocorrência de tapetes (○); tapetes não detectados (x).....85

Figura 3. Ocorrência de Tapetes e composição de acordo com Grupos Morfofuncionais (A), intensidade do vento (B), temperatura do ar (C), precipitação total (D) e umidade relativa do ar (E) da Lagoa dos Patos (RS – Brasil) entre Novembro de 2012 e janeiro de 2014. Flagelados mixotróficos unicelulares (UMF); flagelados autotróficos coloniais (CAF); cianobactérias filamentosas (FCY) e coloniais (CCY);

diatomáceas cêntricas (CDI) e penadas (PDI); algas verdes cocóides e unicelulares (GCU); algas verdes coloniais ou cenobiais (GCC); e algas verdes filamentosas (GFI).....87

Figura 4. Análise de Componentes Principais (PCA) da ocorrência de tapetes, composição de acordo com Grupos Morfofuncionais, intensidade do vento, temperatura, precipitação total e umidade relativa do ar da Lagoa dos Patos (RS – Brasil) entre Novembro de 2012 e janeiro de 2014. Ocorrência de tapetes (●); tapetes não observados (x); flagelados mixotróficos unicelulares (UMF); flagelados autotróficos coloniais (CAF); cianobactérias filamentosas (FCY), heterocitadas (HCY) e coloniais (CCY); diatomáceas cêntricas (CDI) e penadas (PDI); algas verdes cocóides e unicelulares (GCU); algas verdes coloniais ou cenobiais (GCC); e algas verdes filamentosas (GFI).....88

Capítulo 4: Efeito da Aclimação e Estresse Salino em *Anabaena* sp. isolada de um Tapete Microbiano Estuarino

Figura 1. Árvore Filogenética de 26 espécies de cianobactérias. Árvore de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-joining Tree*) baseado em seqüências do DNA ribossômico 16S evidenciando a origem evolutiva de *Anabaena* sp. (●). *Gloeobacter violaceus* foi considerada uma cianobactéria basal e *E. coli* foi utilizada como grupo externo (*outgroup*).....98

Figura 2. Desenho Experimental do ensaio de Redução de Acetileno (ARA) usando filtros de fibra de vidro Whatman GF/F do Experimento 2.....101

Figura 3. Experimento 1 com filtro: etileno reduzido em diferentes concentrações de clorofila-*a* de *Anabaena* sp.....104

Figura 4. Experimento 1 sem filtro: etileno reduzido em diferentes concentrações de clorofila- <i>a</i> de <i>Anabaena</i> sp.....	104
Figura 5. Contagem celular de culturas de <i>Anabaena</i> sp. nos tratamentos com salinidade $\cong 0$ (BG11°), $\cong 15$ (BSN°) e $\cong 30$ (ASN3°).....	105
Figura 6. Teor de Clorofila- <i>a</i> de culturas de <i>Anabaena</i> sp. nos tratamentos com salinidade $\cong 0$ (BG11°), $\cong 15$ (BSN°) e $\cong 30$ (ASN3°).....	106
Figura 7. Tempo de duplicação da biomassa (T_2) baseado no teor de clorofila- <i>a</i> ao longo da curva de crescimento de <i>Anabaena</i> sp. em três salinidades diferentes (BG11°=0; BSN°=15; e ASN3°=30).....	106
Figura 8. Contagem de Acinetos de culturas de <i>Anabaena</i> sp. nos tratamentos com salinidade $\cong 0$ (BG11°), $\cong 15$ (BSN°) e $\cong 30$ (ASN3°).....	107
Figura 9. Razão de Células Vegetativas por Heterocitos de culturas de <i>Anabaena</i> sp. nos tratamentos com salinidade $\cong 0$ (BG11°), $\cong 15$ (BSN°) e $\cong 30$ (ASN3°).....	108
Figura 10. Redução de Acetileno e Fixação de moléculas de nitrogênio de culturas de <i>Anabaena</i> sp. nos tratamentos com salinidade $\cong 0$ (BG11°), com exposição de uma hora ao BG11° (BG11°/ BG11°) e ao BSN° (BG11°/ BSN°); $\cong 15$ (BSN°), com exposição de uma hora ao BSN° (BSN°/ BSN°) e ao BG11° (BSN°/BG11°); e $\cong 30$ (ASN3°), com exposição de uma hora aos ASN3° (ASN3°/ ASN3°) e ao BG11° (ASN3°/BG11°).....	109
Figura 11. Análise de Carbono Orgânico e Nitrogênio total do peso seco de <i>Anabaena</i> sp. nos tratamentos com salinidade $\cong 0$ (BG11°), $\cong 15$ (BSN°) e $\cong 30$ (ASN3°).....	110
Figura 12. Carbono Orgânico (A) e Nitrogênio total (B) por peso seco de <i>Anabaena</i> sp. nos tratamentos com salinidade $\cong 0$ (BG11°), $\cong 15$ (BSN°) e $\cong 30$ (ASN3°).....	110

Figura 13. Nitrogênio total do peso seco da cultura de *Anabaena* sp. nos tratamentos com salinidade $\cong 0$ (BG11°), $\cong 15$ (BSN°) e $\cong 30$ (ASN3°). Dados calculados com base no Nitrogênio total do 30° dia de experimento.....**111**

Lista de Tabelas

Capítulo 1: Revisão Bibliográfica

Capítulo 2: Tapetes Microbianos da Lagoa dos Patos: primeira ocorrência, composição e estruturas erosionais

Tabela 1. Relação de locais de coleta, número de amostras e análises nas fases 1 e 2 de coleta de tapetes microbianos na Lagoa dos Patos (RS – Brasil) entre Novembro de 2012 e Julho de 2014.....**54**

Tabela 2. Lista de espécies de cianobactérias e microalgas encontradas em tapetes microbianos no estuário da Lagoa dos Patos (RS – Brasil).....**62**

Capítulo 3: Tapetes Microbianos da Lagoa dos Patos (RS – Brasil): Sazonalidade e importância de fatores meteorológicos

Tabela 1. Ocorrência de Tapetes Microbianos e dados de vento, temperatura, precipitação, salinidade e nível da água (WL) na Lagoa dos Patos (RS – Brasil) entre Novembro de 2011 e Dezembro de 2012. Linhas em cinza escura evidenciam a ocorrência de tapetes na zona intermareal mediana.....**84**

Capítulo 1: Revisão Bibliográfica

1. Tapetes Microbianos

Tapetes microbianos são densas comunidades bênticas de microrganismos (Stal, 1995) que existem na superfície da Terra a milhões de anos. Esta estrutura proporciona um habitat tridimensional onde uma população microbiana metabolicamente diversa coexiste e interage (Paerl & Yannarell, 2010). Uma propriedade típica de tapetes microbianos é sua estrutura disposta em camadas estratificadas, onde diferentes grupos de organismos ocorrem nas diferentes camadas. Os organismos que compõem cada uma destas camadas produzem diferentes pigmentos, que diferenciam uma camada da outra (Stal, 1995).

Existem várias definições para tapetes microbianos (Gerdes, 2010), entre elas:

- Comunidades estratificadas que se desenvolvem em microgradientes ambientais estabelecidos pela interface da água e substratos sólidos. Eles formam estruturas multilaminares de biofilme que altera os microgradientes ambientais em sua interface como resultado de seu próprio metabolismo (Cohen, 1989).

- Estruturas bênticas laminares, freqüentemente construídas por cianobactérias quando ocorrem na zona fótica (Wachendörfer *et al.*, 1994).

- No *lato sensu*, são comunidades microbianas predominantemente compostas por procariotos que colonizam superfícies. Implícito nesta definição está entendido que ocorre uma interação íntima entre os microrganismos, a superfície colonizada, e o ambiente que os circunda (Stolz, 2000).

- Ocorrem comumente na superfície de sedimentos e detritos particulados, e rapidamente é formada uma nova superfície sobre o sedimento (Decho, 2000).

- Tapetes microbianos são comunidades microbianas intimamente entrelaçadas, incluindo estruturas laminadas, concêntricas e padrões de crescimento em rede, que devido o seu crescimento em espessura para cima, gradientes físico-químicos, barreiras e a matriz pegajosa de exopolissacarídeos (EPS) que captura grãos minerais, produz novos minerais, e finalmente, forma estruturas sedimentares rochosas esferulítica e laminada (Krumbein, 1983; Krumbein *et al.*, 2003).

Apesar do reconhecimento destas várias definições é comum a confusão entre os termos “tapete microbiano” e “biofilme”. Por definição um tapete microbiano é um biofilme, considerando o compartilhamento de diversas características entre ambos (Neu, 1994): (1) cooperatividade fisiológica de organismos; (2) presença de uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) e outros compostos orgânicos e inorgânicos associados ao substrato; (3) a propriedade adesiva dos EPSs; (4) a afinidade por interfaces e substratos; (5) agregação de microorganismos; e (6) o alto conteúdo de água em sua estrutura (Gerdes, 2010). No entanto outras características distinguem estes dois termos, pois tapetes microbianos são frequentemente formados por organismos capazes de se locomover (e.g. diatomáceas e cianobactérias); e tapetes microbianos formam estruturas sobre o sedimento, enquanto biofilme pode consistir em lâminas soterradas (Gerdes, 2010). Desta forma, tapetes microbianos podem ser considerados biofilmes na zona intermareal em estágio avançado formando lâminas ou manchas sobre o sedimento, que refletem lacunas na sedimentação e erosão, ou em outras palavras, onde há tempo para crescimento da comunidade, concentração de biomassa e sucessão ecológica (Gerdes, 2010).

Nos tapetes microbianos as cianobactérias, que geralmente estão associadas às camadas mais superiores, podem ser os organismos chave, iniciando a colonização do sedimento, e permitindo a coexistência de diversos microrganismos e seus metabolismos (Stal, 1995). Tapetes microbianos podem ser compostos por diatomáceas, bactérias autotróficas e heterotróficas, metanogênicos e outros grupos. Além disso, a quantidade de metabolismos diferenciados chama a atenção, podendo incluir organismos tanto aeróbicos quanto anaeróbicos, ou mesmo organismos que apresentem estes dois metabolismos, separados por uma escala temporal e/ou espacial (Stal, 1995).

Os tapetes microbianos são observados em diversos ambientes aquáticos ou terrestres: (I) planícies costeiras e arenosas, onde vastas áreas da zona intermareal são cobertas e onde ocorrem flutuações no nível de água, salinidade e temperatura; (II) ambientes hipersalinos que podem ocorrer em lagoas costeiras rasas e abrigadas com alta taxa de evaporação e pouca precipitação, como na costa do Mar Vermelho (Paerl & Yannarell, 2010); (III) Fontes termais, onde a combinação de alta temperatura com disponibilidade de H_2S ou condições ácidas diminui a biodiversidade, mas principalmente em fontes termais em condições alcalinas ou quase neutras e caracterizadas por temperaturas acima de $70^{\circ}C$; (IV) Ambientes terrestres que vão desde dunas costeiras a desertos e superfícies rochosas onde as cianobactérias possam criar uma crosta ou camadas. Estes ambientes exigem resistência a ciclos de dessecação/reidratação e altas temperaturas. Devido à grande variedade estrutural entre os tapetes e os diferentes fatores que podem influenciá-lo, nesta revisão trataremos apenas dos tapetes que ocorrem em zonas intertidais e dos fatores que influenciam sua ocorrência.

2. Formação dos Tapetes Microbianos

A estrutura dos tapetes microbianos só é possível devido a determinadas características ambientais e o fluxo de energia química entre as diferentes populações. Inicialmente, o desenvolvimento dos tapetes depende de um substrato estável como rochas, solo argiloso ou não exposto à erosão (Stock & Ward, 1991; Schieber *et al.*, 2007). Este substrato deve se apresentar estável por tempo suficiente para que uma comunidade se consolide. Após a consolidação de uma comunidade, os próprios organismos colaboram com a estabilização do substrato, principalmente por meio da produção de metabólitos secundários (Riding, 2000).

2.1. A Colonização do Sedimento

A colonização do sedimento no estágio inicial da formação de um tapete microbiano depende fundamentalmente da estabilidade do sedimento. Esta estabilidade pode ser determinada pela resistência do sedimento a erosão e ressuspensão, ou pela hidrodinâmica local. De acordo com o Diagrama de Hjulström (Fig.1), sedimentos como silte e argila (até 0,1 mm) têm uma grande resistência a erosão, e a velocidade de fluxo de água deve ser alta para que o sedimento seja ressuspenso. Por outro lado, sedimentos arenosos (de 0,1 a 1,0 mm) apresentam maior sensibilidade à erosão. Estes ambientes são passíveis de serem colonizados por tapetes microbianos quando as condições de hidrodinâmica assim permitirem, mas ambientes com sedimentos mais grossos estão associados a ambientes de alta energia de onda, onde não é possível ocorrer a colonização do sedimento.

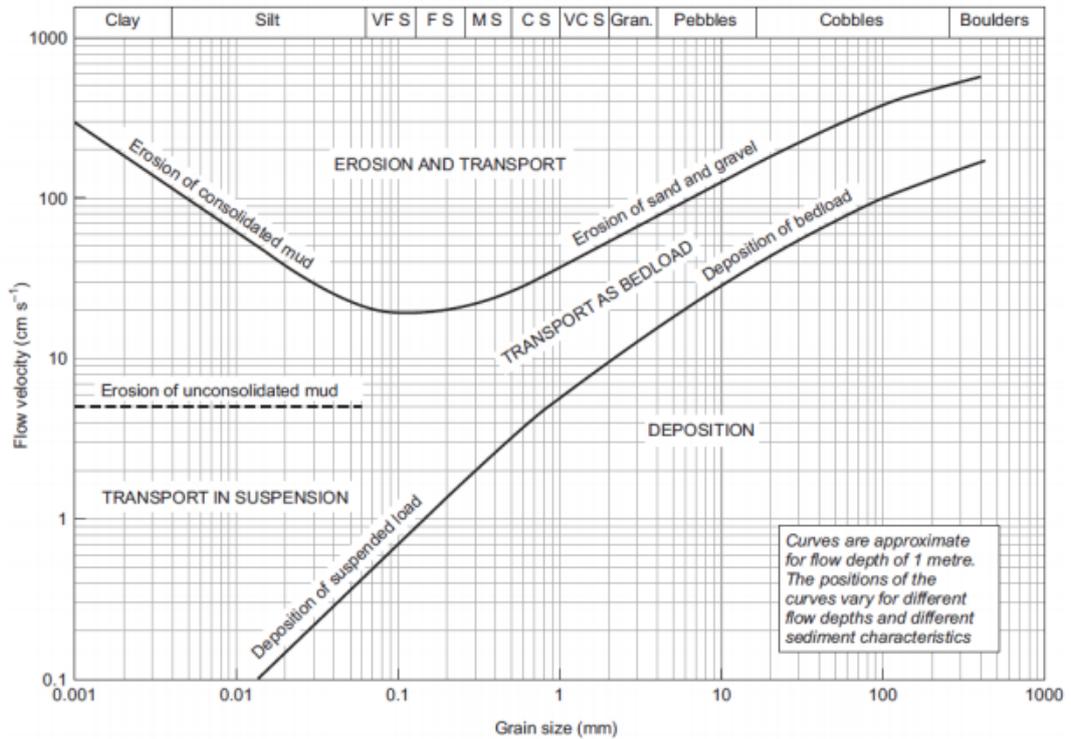


Figura 1. Diagrama de Hjulström e a relação entre velocidade de fluxo e tamanho do sedimento na erosão, transporte e sedimentação (Nichols, 2009).

Diversos fatores podem alterar a hidrodinâmica local, entre eles os fatores meteorológicos possuem importante papel especialmente para zonas intertidais de estuários. A maioria dos artigos têm relacionado erosão de sedimentos colonizados por comunidades microbianas em zonas intertidais com variações de maré, altura de onda, fluxo de energia, transporte de sedimento e frequência de chuva (Eckman *et al.*, 2008, Lamote *et al.*, 2012, Cuadrado *et al.*, 2013, Fagherazzi *et al.*, 2014, Gladis-Schmacka *et al.*, 2014), mas também mostram relações com outros fatores importantes, tais como dessecação, evaporação, umidade, radiação solar e temperatura do sedimento (Coelho *et al.* 2009, Pan *et al.*, 2013). Descreveremos a importância de cada um destes fatores mais adiante.

O tipo de sedimento pode determinar o microrganismo colonizador em reflexo da disponibilidade de nutrientes. De acordo com Stal (2010) sedimentos como silte e argila

estão associados a maior disponibilidade de nutrientes, e são frequentemente colonizados por tapetes formados por diatomáceas, enquanto sedimentos arenosos, com menor aporte de nutrientes, são frequentemente dominados por cianobactérias. No entanto esta relação nem sempre é muito clara, e alguns trabalhos mostram relação inversa do sedimento e composição dos tapetes (Pan *et al.*, 2013).

O conjunto de características ambientais e as relações entre elas e os componentes biológicos determinam as superfícies sedimentares colonizadas. Esta premissa é válida mesmo em pequena escala, pois frequentemente são observadas grandes áreas cobertas por tapetes extremamente estratificados, apresentando de pequenas manchas a grandes bolsões de erosão que podem ser explicados por erosão em pequena escala (Stal, 2010)

Foram definidas ao menos cinco fases de desenvolvimento de um biofilme (Stoodley *et al.*, 2002), que segundo Noffke (2010) são os mesmos para tapetes microbianos (Fig.2). No estágio inicial o tapete é um simples biofilme que começa a liberar EPS, mas a camada colonizada não é macroscopicamente visível e pode ser facilmente erodida pelo fluxo de água. Seu desenvolvimento leva a formação de uma lâmina contínua macroscopicamente visível e que responde imediatamente a mudanças ambientais, o tapete propriamente dito. O desenvolvimento de estágios mais avançados dependerá da disponibilidade de nutrientes e substrato, levando a formação de uma comunidade espessa, multiestratificada, e colorida pela ocorrência de ao menos três diferentes grupos de microrganismos em diferentes camadas. Este é o estágio máximo atingido por um tapete, e o estágio final é a dispersão de células isoladas ou a destruição do tapete, onde ele é erodido em pequenos fragmentos e transportado pelo fluxo de água, servindo como novos núcleos de colonização de sedimento (Noffke 2010). Em tapetes intertidais de praias arenosas os microbiologistas focam especialmente em tapetes do estágio três e quatro.

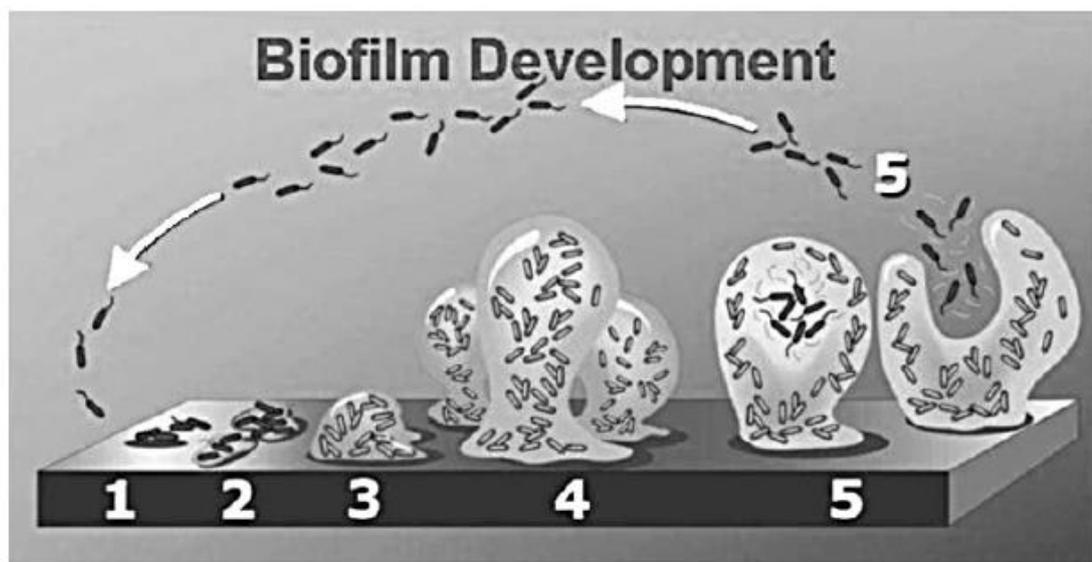


Figura 2. Formação de um biofilme em cinco estágios. Estágio (1) células se aderem a superfície sedimentar; (2) produção e liberação de EPS resulta em uma maior adesão irreversível ao substrato; (3) desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme ou tapete microbiano; (4) maturação da estrutura de biofilme e formação de estrutura multilaminar em tapetes microbianos; (5) dispersão de células livres ou fragmentos do biofilme e tapete microbiano (Adaptado de Stoodley *et al.*, 2002).

Uma vez colonizado, o sedimento passa a apresentar maior resistência à erosão, especialmente devido à formação de redes de filamentos e liberação de exopolissacarídeos (EPS), que nivelam a superfície sedimentar e a tornam mais coesa, diminuindo assim o atrito na interface água-sedimento. Embora mais estável, a manutenção da comunidade de tapete depende do equilíbrio entre forças físicas e a resistência do sedimento a erosão. Quando a quebra deste equilíbrio resulta em erosão, é possível observar na superfície do sedimento registros deste evento (Noffke *et al.*, 2001). O nível de estresse para o ponto de erosão incipiente, quando a erosão passa a afetar a estrutura do tapete microbiano, é chamado Ponto de Corte Crítico (*Critical Shear Stress*), e qualquer aumento deste ponto crítico causado pela comunidade de tapete é denominado bioestabilização (Nofke, 2010). A tendência é de que quanto mais velha for a comunidade de tapete, maior será o Ponto de Corte Crítico (Cuadrado *et al.*, 2014).

Na última década diversos estudos têm focado na geobiologia para a maior compreensão da formação de um dos mais antigos registros de vida na Terra, os estromatólitos. Os estromatólitos são registros fósseis de tapetes microbianos e os mais antigos datam entre 3,4 e 3,5 milhões de anos. Os estudos das formações destes registros fósseis e a comparação com a estrutura de tapetes microbianos atuais colaboram para a compreensão das condições ambientais pelas quais estas comunidades foram expostas (Brendan *et al.*, 2009). O termo Estruturas Sedimentares Induzidas por Microorganismos (do inglês, *Microbially Induced Sedimentar Structures* – MISS) foi proposto por Noffke *et al.* (2001) para definir como a comunidade microbiana pode interferir na estabilização do sedimento e ser afetada pelas condições ambientais. O termo inclui o nivelamento (*leveling*), a bioestabilização, a impressão, separação de grãos e aprisionamento (*baffling/trapping* e *biding*) do sedimento.

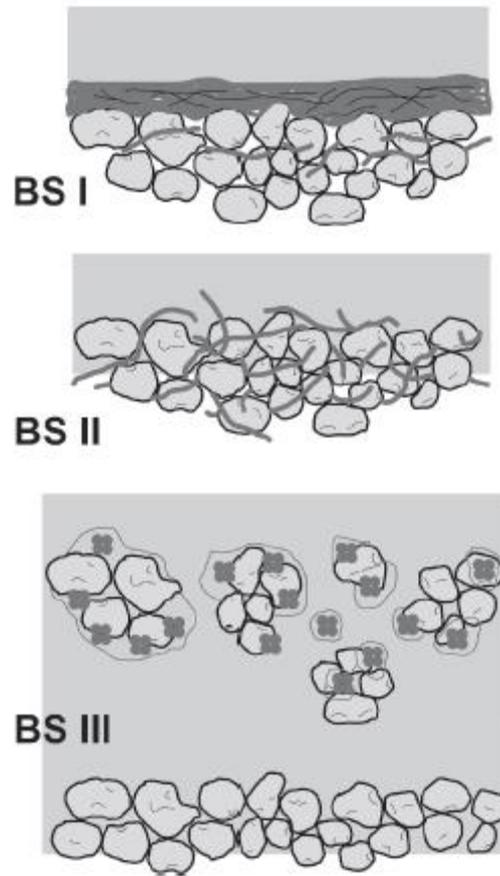


Figura 3. Bioestabilização do sedimento por cianobactérias bênticas. Bioestabilização do Tipo I (BSI) ocorre em função do efeito de fixação do sedimento por EPS e da coesa rede de feixes de filamentos espessos do tapete microbiano epibentônico. Bioestabilização do Tipo II (BSII) ocorre em função do efeito da fixação do sedimento por tricomas simples que entrelaçam as partículas da superfície do sedimento (tapete microbiano endobentônico). Bioestabilização do Tipo III (BSIII) ocorre em função de biofilmes que envelopam os grãos de sedimento formando agregados biótico-minerais. Estes agregados flutuam facilmente e permanecem em suspensão até serem depositados na superfície intermareal (adaptado de Noffke 2010)

No nivelamento os microrganismos preenchem depressões no substrato, como por exemplo, em *ripples*. A bioestabilização pode ocorrer de três formas distintas: (1) pela fixação do sedimento a partir da liberação de EPS e formação de feixes grossos de filamentos de cianobactérias; (2) fixação dos sedimentos por tricomas individuais que se entrelaçam com as partículas de sedimento da camada de superfície; e (3) pela formação de agregados bióticos-abióticos pelo revestimento de grãos por metabólitos do tapete

(Fig. 3). As impressões são marcas deixadas por tapetes soterrados. A separação dos grãos é causada pela comunidade periférica que vai formando uma camada no entorno dos grãos afastando um do outro. Por fim, o aprisionamento se dá por uma seqüência de eventos. No primeiro (*baffling*) os filamentos orientam-se perpendicularmente em direção ao substrato, formando uma rede que captura o sedimento. No segundo evento (*Trapping*) os grãos são capturados por esta rede devido à redução do fluxo que passa por estes filamentos. E por fim, no último evento (*Bidding*) os grãos são encobertos por polissacarídeos que formam aglomerados compostos por sedimento e microorganismos. A partir deste momento, o tapete pode passar a apresentar diferentes horizontes estratificados (Noffke, 2010).

Atualmente MISS consiste em cinco categorias de estruturas sedimentares (crescimento, bioestabilização, captura de grãos depositados sobre o tapete com ou sem produção de EPS) que incluem 17 estruturas características de diferentes fases do desenvolvimento de tapetes microbianos, resumidas no diagrama abaixo:

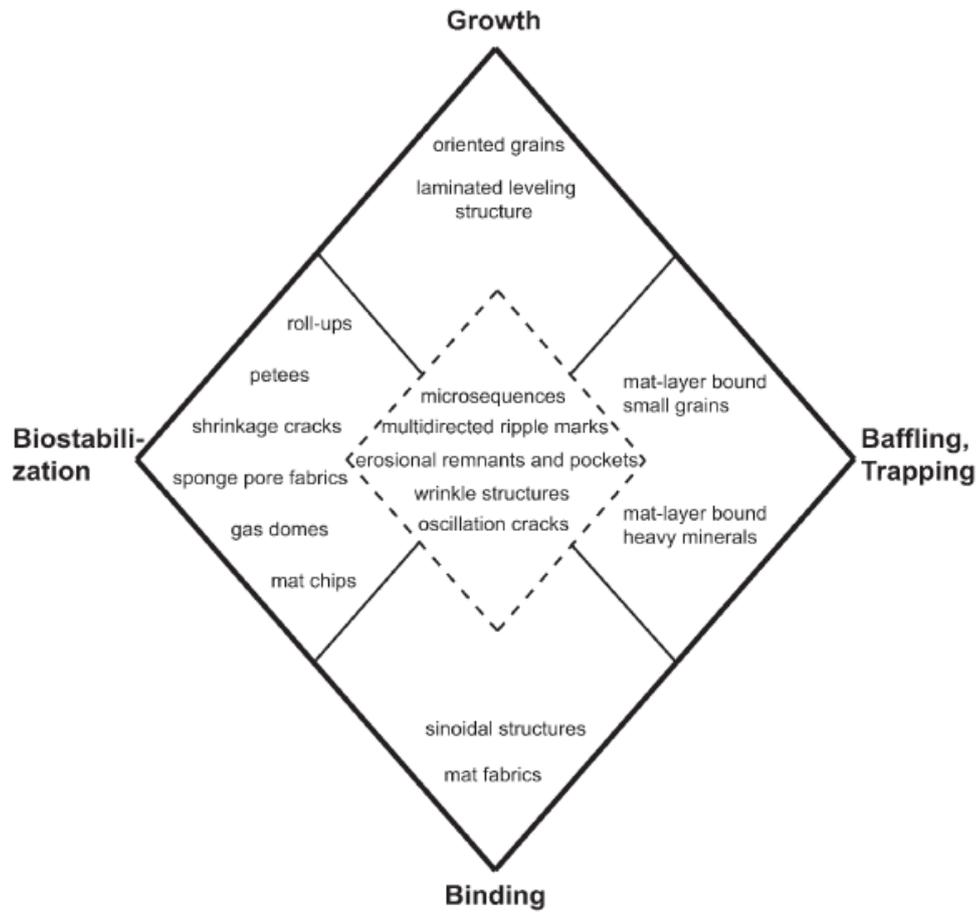


Figura 4. Classificação das Estruturas Sedimentares Induzidas por Microrganismos (MISS). O diagrama mostra a relação de formação de todos os MISS. As estruturas são induzidas por crescimento, bioestabilização, abafamento, aprisionamento, ou coesão. O centro do diagrama inclui MISS formadas pela interferência de todas as interações físico-bióticas (Noffke 2010).

3. Estrutura dos Tapetes Microbianos

A espessura de um tapete pode ir desde alguns milímetros até centímetros, enquanto o comprimento pode variar em uma escala ainda maior. Quando atingem grandes espessuras, os tapetes podem sofrer poucas modificações por anos, permanecendo em estado estacionário, onde o contínuo crescimento é equilibrado pela morte celular e decomposição (Doemel & Brock, 1977; Franks & Stolz, 2009). Estes tapetes podem apresentar uma estratificação visível a partir de diferentes gradientes. Os

gradientes podem ser físicos (ex: luz, temperatura, salinidade e etc.) ou químicos (ex: oxigênio, gás carbônico, sulfato e etc.).

Na Laguna Figueroa (Baja Califórnia, México) existem tapetes que são bons exemplos de comunidade estratificada. Nestes tapetes podem ser encontradas até sete camadas e uma grande diversidade de organismos e metabolismos diferentes. Na camada mais superficial, de cor amarela, foram encontradas diversas diatomáceas cuja cor se dava pelo acúmulo de determinado tipo de carotenóides. Na camada seguinte, verde, foram encontradas cianobactérias principalmente as dos gêneros *Lyngbya* e *Oscillatoria*. A camada abaixo, e última com presença de oxigênio tem coloração rosa devido a presença de bactérias sulfúricas púrpuras. Todas as camadas a seguir são dominadas por bactérias anaeróbicas. As camadas a seguir apresentavam coloração salmão, devido à presença de bactérias roxas sulfúricas e bacterioclorofila b, oliva, com bacterioclorofila c e bactérias verdes sulfúricas e por fim uma camada sulfurosa preta (Franks & Stolz, 2009). Naturalmente esta estrutura não será encontrada em todos os tapetes, mas apenas por alguns daqueles que atingirem o quarto estágio de desenvolvimento de um tapete (descrito anteriormente), mas sua alta estratificação serve como exemplo para a grande diversidade que pode ser abrigada neste tipo de comunidade.

De modo geral, estas camadas podem ser agrupadas em duas regiões de acordo com a fonte de energia que utiliza. A primeira e mais superficial é chamada zona fótica, agrupa as duas primeiras camadas, onde a fotossíntese é a principal fonte de energia. Segundo Doemel & Brock (1977), tapetes microbianos de fontes em Yellowstone teriam se formado a partir de cianobactérias bentônicas que cresceram até atingir uma espessura em que a luz não conseguisse mais atingir níveis inferiores. A partir deste momento, passava a ocorrer um equilíbrio entre crescimento e decomposição, pois

sempre que havia o crescimento na superfície do tapete, as cianobactérias das camadas mais inferiores deixavam de receber luz, morriam e sofriam lise celular. Desta forma, por mais que crescesse o tapete, a zona fótica permanecia com o mesmo tamanho. A segunda zona é conhecida como zona afótica, onde a decomposição é o processo dominante, e não mais a fotossíntese.

Além disso, o tapete também pode ser dividido em zona óxica e anóxica. Na zona fótica existe uma porção superior oxigênica, onde há disponibilidade de oxigênio, e uma porção mais inferior anóxica, onde o oxigênio passa a ser um fator limitante. A zona afótica é toda anóxica (Baumgartner *et al.*, 2006).

4. Organismos formadores de Tapetes

Partindo do princípio que as condições físicas e químicas de uma determinada superfície sedimentar são ideais, um organismo pioneiro começa a colonização, cujo desenvolvimento estabiliza a superfície sedimentar evitando a ressuspensão (Decho, 2000). A sobreposição de indivíduos vivos desta espécie sobre indivíduos mortos cria gradientes de fatores físicos, químicos e biológicos (Stock & Ward, 1991). De forma geral, quatro diferentes organismos formam os tapetes, que normalmente coexistem, podendo ou não haver dominância de algum destes grupos. De acordo com o organismo dominante os tapetes podem ser denominados cianobacterianos (Zehr *et al.*, 1995; Ward *et al.* 1998); tapetes de diatomáceas (Underwood *et al.*, 1999; Sundbäck *et al.* 1997), tapetes algais, referindo-se geralmente às algas verdes (Sundbäck, 1996; Vázquez, 2004); ou tapetes bacterianos (Prieur, 1997).

Diatomáceas

São muitas vezes responsáveis pela colonização e construção da comunidade de tapete e são freqüentemente os organismos mais diversos entre os organismos fotossintetizantes. A maioria das diatomáceas de tapetes são penadas (Vinocur &

Pizarro, 2000; Woelfel *et al.*, 2007), que são representadas principalmente por organismos bentônicos.

A maioria dos trabalhos referentes diatomáceas formadoras de tapetes estão associados a duas características deste táxon: capacidade de locomoção e produção de polissacarídeos. Como as diatomáceas colonizam as camadas mais superiores do tapete, sua locomoção está principalmente associada à intensidade da radiação solar e variações de maré (Sundbäck *et al.*, 1996b; Sundbäck *et al.*, 1997; Underwood *et al.*, 1999). A produção de polissacarídeos por sua vez esta associada à fixação do substrato, essencial para a formação do tapete, e proteção contra a dessecação quando, por exemplo, a maré baixa expõe o tapete.

Bactérias

Em tapetes microbianos podemos observar a grande versatilidade nutricional e diversidade metabólica das bactérias. Isso porque em tapetes microbianos podemos encontrar bactérias autotróficas e heterotróficas que utilizam as mais variadas fontes de energia. As Autotróficas podem ser representadas pelas quimiotróficas/quimiolitotróficas, fotossintetizantes aeróbicas e fotossintetizantes anaeróbicas. Já as heterotróficas podem ser representadas pelas que fazem respiração aeróbica ou anaeróbica e fermentação.

Os procariontes autótrofos fotossintetizantes transformam energia luminosa em energia química. A fotossíntese aeróbica é feita pelas cianobactérias, enquanto a anaeróbica, além de ser feita por cianobactérias, também é realizada por bactérias púrpuras e verdes. As quimiolitotróficas, na presença de oxigênio reoxidam diversos produtos liberados por outras bactérias para a produção de ATP.

Os procariontes heterótrofos aeróbicos utilizam O_2 como acceptor final de elétrons para a formação de ATP. Os anaeróbicos utilizam NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} e HCO_3^- .

Apesar da grande diversidade metabólica que existem entre os organismos procariontes de tapetes, apenas as cianobactérias serão discutidas mais profundamente, pois são as principais formadoras de tapetes, e principal foco deste trabalho.

As cianobactérias são uma das formas de vida mais antigas do planeta. Elas não só transformaram as condições da Terra, como também precisaram se readaptar as condições que elas mesmas ajudaram a criar. Um exemplo foi a variação nas concentrações de CO₂ e O₂. Inicialmente, quando as primeiras cianobactérias surgiram há pelo menos 3,5 bilhões de anos, as concentrações de CO₂ eram pelo menos 100 vezes maiores que as encontradas hoje. Há 400 milhões de anos atrás, as condições já haviam mudado bastante, o nível de oxigênio cresceu significativamente, principalmente devido à fotossíntese das cianobactérias, e os níveis de CO₂ decaíram à concentrações semelhantes às encontradas atualmente. Essas mudanças podem ter criado uma pressão que levou ao aperfeiçoamento do mecanismo de fixação de CO₂ (CCM) em cianobactérias (Badger & Price, 2003).

Entre os organismos autotróficos, as cianobactérias estão entre as que ocupam a maior diversidade de ambientes, sejam eles locais quentes ou frios; ácidos ou alcalinos; marinhos, de água doce, salinos ou terrestres; e em simbiose. Esta adaptabilidade se deve em parte ao fato de terem resistido a diversas mudanças ambientais ao longo de sua evolução (Giordano et al., 2005). Esta variação temporal e espacial tem direcionado as forças evolutivas e a aquisição de alguns genes e propriedades fisiológicas que permitem o crescimento com sucesso de cianobactérias em diversos ambientes nos quais elas são encontradas hoje em dia (Badger *et al.*, 2006). Desta forma, cada situação extrema na qual as cianobactérias são capazes de obter sucesso está relacionada a uma adaptação.

Tais adaptações somadas a versatilidade metabólica apresentada pelas cianobactérias fazem com que elas sejam amplamente distribuídas. Elas podem viver em ambientes anóxicos fazendo fotossíntese anóxica, utilizando sulfeto como doador de elétron (Shahak & Hauska 2008); assimilando açúcar e outros compostos orgânicos sob luz pela fotoheterotrofia (Nold & Ward, 1996); e respirando carboidrato endógeno no escuro (Mur *et al.*, 1999). Em condições anóxicas são capazes de se manter fazendo fermentação (Stal & Moezelaar, 1997) e quimioorganotrofia.

Além de toda adaptabilidade citada, principalmente ligada ao CCM, algumas cianobactérias filamentosas também possuem células diferenciadas em relação às vegetativas conhecidas como heterocitos. Nesta célula especializada ocorre a fixação de nitrogênio, cujos mecanismos serão discutidos mais adiante no ciclo do nitrogênio. Algumas destas cianobactérias fixadores de nitrogênio também podem apresentar formas de resistência conhecidas como acinetos. Quando as condições ambientais são inapropriadas para a sobrevivência, algumas cianobactérias produzem acinetos, de modo que o material genético seja preservado para o momento em que as condições ambientais voltem a ser propícias a manutenção da vida. Desta forma, quanto maior for a densidade de acinetos menos propícias são as condições para o crescimento desta cianobactéria (Stal, 1995; Kaplan-Levy *et al.*, 2010; Komarèk, 2013).

5. Fatores Físicos, químicos e biológicos

A ocorrência no tempo ou espaço de tapetes microbianos é reflexo das interações que ocorrem entre os componentes físicos, químicos e biológicos da comunidade de tapete e do ambiente ao seu redor. O modelo conceitual da Fig. 5 sumariza a importância de alguns destes fatores para a distribuição de tapetes.

Os fatores físicos e químicos são especialmente moduladores espaciais e temporais. As condições de hidrodinâmica, que influenciam na erosão e deposição de

sedimentos, temperatura, insolação, dessecação, pH e oxigênio determinam onde e quando os tapetes ocorrerão e que organismos serão formadores da comunidade.

Entre os fatores biológicos estão os controles “*Top-down*” e “*Bottom-up*”. O controle *Top-down*, exercido por predadores de topo ou intermediário, levou à redução da ocorrência de tapetes após um período de dominância no Pré-Cambriano (Brendan *et al.*, 2009), e é um dos principais fatores que atualmente limitam a ocorrência de comunidades de tapetes em ambientes estressantes como a zona intermareal. Por outro lado, fatores de controle *Bottom-up*, são aqueles limitantes a produção de energia e biomassa, tais como disponibilidade de nutrientes e luz, sejam eles por competição ou por questão ambiental (Thompson *et al.*, 2004).

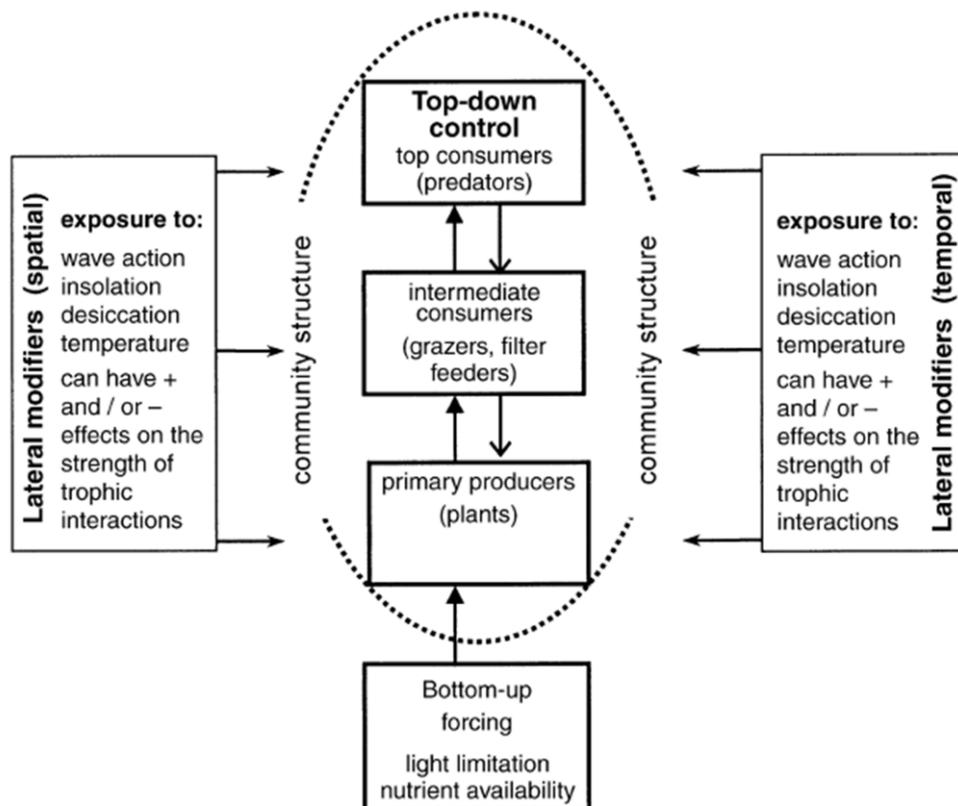


Figura 5. Modelo conceitual do papel do estresse físico operando lateralmente em todos os níveis tróficos (setas laterais), das forçantes “*bottom-up*” (fatores limitantes físico químicos - setas superiores) e “*top-down*” (predação e pastejo – setas inferiores) na regulação da estrutura da comunidade de tapete. Adaptado de Thompson et al. (2004).

5.1. Modificadores Laterais (tempo e espaço)

5.1.1. Hidrodinâmica

As comunidades de tapetes freqüentemente ocorrem associadas à zona mesomareal, onde o sedimento está constantemente exposto a eventos de erosão e deposição, ou superior, mais afetada durante eventos de maré alta ou tempestades. Muitos estudos têm mostrado a importância de comunidades microbianas psâmicas na bioestabilização de sedimentos e registro de eventos de erosão (Noffke and Petterson, 2008; Noffke, 2010; Pan et al. 2013).

A maioria dos artigos tem relacionado erosão de sedimentos colonizados por comunidades microbianas em zonas intertidais com variações de maré, altura de onda, fluxo de energia, transporte de sedimento e freqüência de chuva (Eckman *et al.*, 2008, Lamote *et al.*, 2012, Cuadrado *et al.*, 2013, Fagherazzi *et al.*, 2014, Gladis-Schmacka *et al.*, 2014).

5.1.2. Dessecação

Diversos trabalhos relatam o estresse gerado pela dessecação em ambientes intertidais, especialmente quando associada a variações de maré, exposição à radiação solar e vento. Tapetes se correlacionam negativamente com condições que favorecem a evaporação de água do sedimento, como alta temperatura e radiação solar (Pan *et al.*, 2013). A dessecação leva a redução da atividade fotossintética, refletindo na produtividade primária da biomassa (Coelho *et al.*, 2009).

A dessecação obriga os organismos a entrarem em um estágio de anidrobiose, na qual apresentam pouca água intracelular e baixa taxa metabólica. Entre os microrganismos que são capazes de permanecer em anidrobiose estão as bactérias, leveduras e fungos. No entanto, este estágio pode levar a morte quando os lipídios

chegam a uma fase de mudanças irreversíveis. As proteínas e ácidos nucleicos desnaturam e quebram-se ocorrendo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Dose *et al.*, 1995).

Os mecanismos para evitar a morte pela dessecação têm os mesmos princípios dos mecanismos de resistência a salinidade, pois ambos afetam o equilíbrio osmótico das células. Inclusive o estresse salino é muitas vezes chamado de “seca fisiológica”. As estratégias de resistência consistem no acúmulo de K^+ , glutamato, glutamina, prolina, glicina-betaina, sacarose e trealose (Crowe *et al.*, 1992; Potts, 1994).

5.1.3. Temperatura

Tapetes microbianos são encontrados da Antártica (Priscu *et al.*, 1998; Taton *et al.*, 2003) a nascentes de água quente (Ward *et al.*, 1998; Roeselers *et al.*, 2007) e fontes hidrotermais (Alain *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2005). Os tapetes podem ocorrer nas mais diversas temperaturas devido à versatilidade dos organismos que compõem estas comunidades. Organismos psicrófilos, que são adaptados à vida em ambientes extremamente gelados, muitas vezes oligotróficos, vivem com traços de nutrientes e tem um longo tempo de geração. Já a temperatura da água em fontes hidrotermais de oceanos profundos, além de estar sob alta pressão, pode exceder 400°C, e mesmo assim tapetes microbianos podem se desenvolver neles e se manter por quimiolitotrofia (Zierenberg *et al.*, 2000). Organismos associados às nascentes de água quente e fontes hidrotermais se distribuem conforme sua temperatura ótima de crescimento, e ecotipos de uma mesma espécie podem viver em diferentes intervalos deste gradiente.

Em zonas intertidais de regiões estuarinas a temperatura flutua entre valores mais intermediários, de próximo a zero até 45 °C, quando exposto na maré baixa. Em tapetes microbianos na Bahía Blanca (Argentina), a ocorrência destes pode ser parcialmente explicada pela temperatura do sedimento, com o desenvolvimento ótimo de tapetes de

cianobactéria e diatomáceas entre 10 e 15 °C, especialmente durante o inverno. Este resultado contrasta com outros de ambientes temperados, que encontraram maior biomassa durante o verão (Noffke & Krumbein 1999, Solé *et al.* 2001)

5.1.4. Salinidade

Organismos vivem em ambientes com água desde essencialmente destilada até saturada (Rothschild & Mancinelli 2001). No entanto, o problema da salinidade não reside no fato de o ambiente ser ou não salino, pois os organismos estão adaptados à estas condições. O problema se dá quando há hipersalinidade ou sua concentração varia drasticamente em um curto período de tempo. Tais condições podem afetar a diversidade microbiana, fotossíntese, respiração e fixação de nitrogênio (Fernandes *et al.*, 1993; Abed *et al.*, 2007). Sendo assim, a resiliência de um tapete microbiano a diferentes regimes de salinidade esta ligada ao ajustamento da diversidade e funcionalidade das comunidades microbianas (Abed *et al.*, 2007).

Os aspectos osmóticos para a vida em concentrações altas de sal é conhecida como osmofilia, enquanto halofilia são os requerimentos iônicos para a vida nas mesmas condições. Embora sejam coisas distintas, estas duas definições estão intimamente ligadas. Existem organismos adaptados a grande concentração de sais que vão desde micróbios, Archaea, cianobactérias até algas verdes (Rothschild & Mancinelli 2001).

A presença de sal solúvel dissolvido afeta a densidade e atividade química da água, e sob a perspectiva biológica, sua influência no equilíbrio osmótico é particularmente importante. Os organismos apresentam diferentes adaptações para as diferentes salinidades as quais eles estão expostos. Em ambientes marinhos, a concentração de solutos é maior fora das células do que dentro, o que torna o organismo hipotônico em relação ao seu meio. Em uma situação como esta a tendência é de que a

célula perca água para o meio até atingir o equilíbrio osmótico entre o citoplasma e o ambiente. Para evitar a perda de água, a célula utiliza compostos como o glicerol e a glicina-betaina como solúveis compatíveis para atingir um potencial osmótico aparente. Já em ambientes de água doce o problema é o inverso, ou seja, a célula é hipertônica em relação ao meio e sua tendência é a de receber água até atingir o equilíbrio osmótico ou lise celular. Como solução encontrada, a célula faz difusão ativa, liberando a água em excesso para o meio (Franks e Stolz, 2009).

Os efeitos da salinidade sobre comunidades de tapete podem variar significativamente, pois depende do quão adaptada esta comunidade está à estas variações. Entre os efeitos relatados estão o aumento da fixação de N₂ e CO₂ (Pinckney *et al.*, 1995), aumento da concentração intracelular de compostos para regulação osmótica, como por exemplo, glicina (Reed *et al.*, 1984), alteração de características morfológicas de algumas espécies (Shafik *et al.*, 2003), alterações na composição da comunidade (Underwood *et al.*, 1998; Bolhuis *et al.*, 2013) e menor ocorrência de cianobactérias heterocitadas (Stal, 2009)

5.2. Controle Top-down

5.2.1. Influência dos Predadores

A relação entre tapetes microbianos e predadores, principalmente copépodes, ostracodes, chironomidae, poliquetos e oligoquetos (Pinckney *et al.*, 2003) nos leva aos mais remotos tempos do planeta Terra. Os tapetes microbianos mais antigos datam do Pré-cambriano, 3500 milhões de anos atrás, e até 600 milhões de anos atrás eram nestas comunidades que se encontravam os organismos mais abundantes da Terra e formavam recifes tão grandes quanto os recifes de corais que atualmente se formam. Os fatores que levaram a diminuição da abundância e diversidade destas comunidades após este período ainda são controversos. A química dos mares mudou e os tapetes microbianos

podem ter sido superados por algas macroscópicas e/ou predados por metazoários. Embora ambas as hipóteses possam estar corretas, existem evidências baseadas em estromatólitos que corroboram com a segunda opção.

O período quando ocorreu a redução na quantidade de estromatólitos coincide com aumento de registros fósseis de metozoários. Após o surgimento destes organismos, estromatólitos passaram a colonizar ambientes extremos, hipersalinos, quentes ou exóticos, onde existem poucos predadores (Brendan *et al.*, 2009).

Fenchel *et al.* (1998) utilizou experimentos com tapetes microbianos artificiais para demonstrar os efeitos da predação sobre a estrutura da comunidade de tapete, que na presença dos predadores foi destruída em duas semanas. A destruição se deu pela injeção e bioturbação, que altera sua estrutura e integridade funcional. A mesma conclusão pode ser alcançada pela observação de tapetes microbianos dominados por diatomáceas no estuário Westerschelde (Holanda), onde a presença de predadores colapsou a comunidade de tapete (Sahan *et al.*, 2007).

5.3. Controle *Bottom-up*

5.3.1. Disponibilidade de Luz

A radiação solar é de extrema importância não só para a maioria dos tapetes microbianos, mas para a grande maioria das comunidades dos mais diversos ambientes a luz é a base energética que sustenta toda a teia alimentar, influenciando na diversidade, estrutura e bioenergética de tapetes.

Comunidades fotoautotróficas dependem tanto da quantidade de luz propriamente dita (radiação solar quantitativa) quanto de determinados comprimentos de onda (radiação solar qualitativa) que podem ser usados por pigmentos e fotossistemas captadores de luz. A quantidade média de luz que ilumina uma superfície em um dia de sol é de 1000 a 2000 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. No entanto, dependendo do ambiente a absorção e

reflexão da radiação podem ser significativas. A própria água é um atenuante natural da luz, absorvendo a maioria dos comprimentos de onda infravermelha nos primeiros metros (Jørgensen *et al.*, 1987; Polerecky *et al.*, 2007). Partículas e populações de organismos também podem atenuar a luz na camada da água. O tipo de sedimento pode influenciar na profundidade que a luz penetra no solo (Des Marais, 2003).

O fluxo de luz que penetra em um tapete pode ser medido de duas formas: (1) Irradiância descendente, que é luz total que passa por um determinado plano horizontal e pela (2) irradiância escalar, que é a soma de toda a luz que converge para um determinado ponto dentro do tapete (Des Marais, 2003). Devido à presença de organismos fotossintéticos, mucilagem e partículas minerais dentro do tapete, há uma grande absorção e reflexão da radiação ao longo das camadas do tapete. Devido a estes dois fatores, absorção e reflexão, a irradiância descendente pode diferir muito da escalar (Jørgensen & Des Marais, 1988).

A maioria dos fototróficos é adaptada à baixa intensidade de luz e freqüentemente são fotoinibidos pela forte radiação. A intensidade ótima de luz para cianobactérias nos tapetes microbianos na Ilha Mellum no Mar do Norte é 50 a 150 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Para bactérias sulfúricas roxas do mesmo tapete fica entre 5 e 10 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (Stal *et al.*, 1985). As comunidades dos tapetes apresentam diversas estratégias para obter a quantidade ótima de radiação. Algumas cianobactérias são capazes de produzir carotenóides e outros produtos atenuantes de luz, ou mesmo permanecer abaixo de uma camada de sedimentos (Quesada & Vincent, 1997). Da mesma forma, muitos fototróficos são extremamente adaptados para capturar fótons raros em ambientes com limitação de luz (Manske *et al.* 2005, Jochum *et al.* 2008). A localização geográfica é importante no que diz respeito ao crescimento sazonal dos tapetes. Enquanto que em tapetes microbianos tropicais poucas mudanças são observadas ao longo do ano, em latitudes mais ao sul e

ao norte os tapetes estão mais suscetíveis à sazonalidade. No Ártico e na Antártica a comunidade está exposta a grandes períodos de constante luz e escuro.

Os organismos fototróficos podem utilizar diferentes comprimentos de ondas dependendo do fotossistema que cada um desenvolveu, o que permite que uma variedade de microrganismos fototróficos coexista, formando diferentes guildas ou assembléias. As cianobactérias têm tilacóides com clorofila *a* (adaptados a absorção em 680 nm) e ficobilinas (Ex: ficoeritrina e ficocianinas), fototróficos verdes têm clorosomos com bacterioclorofila *c* (740 nm), *d* (725 nm), ou *e* (714 nm), e fototróficos roxos têm membranas intracitoplasmáticas com bacterioclorofila *a* (800-890 nm) ou Bacterioclorofila *b* (1015 nm) (Stolz, 2007).

A produção de O₂ pode ser influenciada pela radiação solar, pois o aumento da penetração da luz, principalmente próximo ao meio dia, tem por conseqüência o aumento da fotossíntese nas camadas mais profundas do tapete. Estruturalmente, o tapete microbiano tem sua zona aeróbica aumentada verticalmente em decorrência da produção de O₂ em camadas mais profundas. A produção líquida de oxigênio (fotossíntese menos o consumo do oxigênio) é dependente da profundidade em que determinado ponto se encontra no tapete, pois quanto mais profunda é a camada, maior tende a ser a taxa de respiração e menor a de fotossíntese (Epping *et al.*, 1999; Wieland & Kühl, 2006).

Níveis de radiação altos o suficiente para classificar um ambiente como extremo raramente ocorrem de forma natural na Terra. No entanto, a radiação UV e ionizante podem afetar o maquinário fotossintético ou mesmo os ácidos nucleicos. No DNA, o risco pode ser direto ou através da produção de espécies reagentes de oxigênio. A produção de antioxidantes e enzimas detoxificantes, mecanismos de reparo ou mesmo comportamento de fuga atenuam os riscos da radiação.

5.3.2. Nutrientes

A ocorrência de todos os organismos de um tapete pode ser afetada pela falta de nutrientes essenciais. A mudança de um meio ambiente com baixo aporte de nitrogênio para um meio sem limitação de nitrogênio, por exemplo, pode aumentar em até 34% a dominância de diatomáceas, enquanto a falta de nitrogênio pode aumentar em 75% a atividade da enzima nitrogenase de cianobactérias e outras bactérias (Pinckney *et al.*, 1995).

A disposição de comunidades microbianas sobre o sedimento pode incluir alguns fatores interessantes no que diz respeito à disponibilidade de nutrientes, tais como: difusão dos nutrientes da coluna d'água; advecção de nutrientes do sedimento; e regeneração de nutrientes já incorporados à comunidade.

Comunidades de tapetes são densas comunidades com alguns milímetros de espessura que colonizam a superfície do sedimento. Naturalmente, esta disposição da comunidade dificulta a distribuição homogênea de nutrientes para a comunidade. Ainda que esta limitação possa criar microgradientes que aumentam a disponibilidade de nichos dentro do tapete, a distribuição de nutrientes essenciais deve chegar a todos os organismos. Entre os principais mecanismos que aumentam a eficiência de captura e distribuição de nutrientes para o tapete estão os mecanismos de captura e armazenamento de nutrientes pelos EPS produzidos pela própria comunidade (Decho, 1994) e formação de diversos microcanais de água cujo fluxo atravessa a comunidade (Stolz, 2000).

Especialmente para estuários, a advecção de água subterrânea pode incrementar a disponibilidade de nutrientes, especialmente nas camadas mais profundas do tapete. A própria entrada da cunha salina em estuários pode biodisponibilizar nutrientes antes

aprisionados no sedimento, e a disposição do tapete na interface água-sedimento pode favorecer a captura destes pela comunidade de tapete.

De acordo com Wetzel (1993), comunidades de tapetes, por serem pouco permeáveis e ocorrerem em locais de pouco fluxo e conseqüente baixa renovação de nutrientes, dependem em parte da regeneração de nutrientes já incorporados a comunidade. Isto diminui a importância do fluxo de água através dos tapetes, e aumenta importância do mutualismo dentro da comunidade através de uma rápida e intensa reciclagem de carbono e nutrientes.

Tapetes Microbianos e o Ciclo do Nitrogênio

O Nitrogênio é de grande importância biológica na produção de biomassa, embora possa ser um dos fatores mais limitantes em muitos ecossistemas (Steppe *et al.*, 2001). Dentro de um tapete microbiano as concentrações de nitrogênio são determinadas pelo balanço entre fonte e sumidouro de nitrogênio (Paerl *et al.*, 1996; Graco *et al.*, 2001). Existem três principais fontes de nitrogênio das quais um tapete pode se beneficiar: nitrogênio dissolvido da camada d'água, oriundo da mineralização e biologicamente fixado. Os tapetes são capazes de se estabelecer em ambientes com limitação de nitrogênio principalmente devido a última fonte citada, a fixação de nitrogênio atmosférico (N_2) por organismos diazotróficos. Ela é um processo exclusivo de procariontes de algumas espécies de eubactérias e cianobactérias (Steppe *et al.* 2001; Steppe & Paerls 2002). O complexo enzimático responsável pela conversão de N_2 em NH_4^+ , a nitrogenase, funciona apenas em condições microanóxicas, sendo desta forma exclusiva de anaeróbicos obrigatórios, microaerófilos ou cianobactérias aeróbicas com heterocitos. Além da inibição pelo oxigênio, outros fatores ambientais como radiação, temperatura, limitação de nutrientes, pH, salinidade e supressão de produtos finais pelo

amônio podem interferir na fixação (Paerl *et al.*, 2000; Steppe *et al.* 2001; Staal *et al.*, 2003a; Staal *et al.*, 2003b; Staal *et al.*, 2007; Severin & Stal, 2008; Severin *et al.*, 2012).

Os heterocitos são células modificadas com espaço intracelular microanóxico que permite a fixação de nitrogênio ainda que o ambiente externo seja aeróbico. Estas células são envoltas por um envelope especializado composto por duas camadas que limita o fluxo de gases. A primeira é composta de um glicolípido hidroxilado e a outra de polissacarídeo. O pouco de oxigênio que consegue ultrapassar esta barreira ou entra pelos nódulos polares que conectam o heterocito às células adjacentes é consumido pela alta atividade da oxidase (Peterson & Burris, 1976; Walsby 2007).

O espaçamento entre os heterocitos de uma cianobactéria filamentosa como *Nostoc* e *Anabaena* não é randômico. Em uma cianobactéria diazotrófica exposta a um ambiente sem reservas de nitrogênio orgânico, e que, portanto necessita do metabolismo fixador de nitrogênio para sobreviver, a probabilidade de uma célula se diferenciar em heterocito é de 10%. Desta forma, em média para cada nove células vegetativas será encontrado um heterocito. De acordo com esta razão, cianobactérias heterocitadas que apresentem um heterocito para cada nove células vegetativas estariam crescendo na dependência do nitrogênio fixado. No entanto, esta razão pode variar conforme a espécie fixadora ou as condições ambientais onde se encontra.

Entre os modelos propostos para explicar o espaçamento dos heterocitos e a definição da célula que se diferenciará estão o modelo de um estágio e de dois estágios. O primeiro propõe que qualquer célula do filamento pode se transformar em heterocito na ausência de nitrogênio orgânico, mas que a partir do momento em que uma célula começa a diferenciação ela inibe o processo das células próximas a ela pela síntese de compostos inibidores. Para o segundo modelo, nem todas as células são aptas a diferenciar-se. Na ausência de nitrogênio orgânico estas células poderão se diferenciar

ou não, o que é definido pelas concentrações de genes *hetR* e *patS*, respectivamente. O *hetR* é sintetizado no início da diferenciação, e seu acúmulo estimula uma produção ainda maior (*feedback* positivo), estimulando assim a diferenciação. A célula diferenciada passa a produzir PatS, que é transportado para as células adjacentes inibindo a diferenciação (Meeks & Elhai, 2002).

A fixação biológica de N₂ é um processo que converte N₂ atmosférico em amônia e é o único processo que compensa a perda de nitrogênio para biosfera causada pela denitrificação (Gallon 1980). A nitrogenase é o complexo enzimático que cataliza a redução de N₂ em NH₃, e posteriormente em glutamina, retornando à célula vegetativa na forma de aminoácido. Este é um processo energeticamente dispendioso, uma vez que envolve o gasto de 16 ATPs, 8 H⁺ e 8 e⁻ (Flores & Herrero 1994, Meeks & Elhai, 2002).

Os principais sumidouros de nitrogênio em tapetes são o soterramento, refluxo e denitrificação. Como é possível perceber, não existem perdas significativas de nitrogênio para a camada d'água, de forma que o tapete se torna um sumidouro de nitrogênio para o ambiente aquático, oferecendo pouco retorno de compostos nitrogenados (Bebout *et al.*, 1994). No entanto, segundo Graco *et al.* (2001), o NH₄⁺ pode colaborar com a produtividade primária da zona pelágica.

6. Delineamento da Tese de Doutorado

Embora diversos estudos já tenham sido feitos acerca da ocorrência de tapetes microbianos, pouco se produziu até o momento no hemisfério Sul. Destacamos aqui os trabalhos de dois dos principais grupos de pesquisa na América do Sul:

Os trabalhos produzidos na Bahía Blanca (Argentina) focam na caracterização de tapetes microbianos intertidais (Pan *et al.*, 2013^b), influência de forçantes físicas

promotoras de erosão (Pan *et al.*, 2013^a), bioestabilização (Cuadrado *et al.*, 2011) e na formação de MISS (Cuadrado e Pizani, 2007; Cuadrado *et al.*, 2013; Cuadrado *et al.*, 2014). No Brasil os estudos têm focado especialmente na composição de tapetes microbianos e formação de MISS (Silva *et al.*, 2004; Silva, *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2007). Estes trabalhos têm mostrado a sensibilidade destas comunidades às forçantes que geram erosão, mas também sua importância para a bioestabilização.

De acordo com Severin & Stal (2010) o maior número de artigos de tapetes do Hemisfério Norte ocorre pela falta de estudos na América do Sul, e não devido à ausência de tapetes microbianos. Nossas observações em campo mostram que a ocorrência para o estuário da Lagoa dos Patos (RS – Brasil) é mais frequente do que se pensava.

Dentro deste cenário de conhecimento dos tapetes microbianos da América do Sul, esta tese começa no Capítulo 2 descrevendo de uma forma geral os tapetes encontrados na Lagoa dos Patos quanto às espécies que os compõem e sua distribuição na zona intermareal. A partir destas observações foi possível ver as relações de curto prazo destes tapetes com variáveis físicas que levam à erosão e deposição de sedimentos na zona intermareal, que são discutidos no Capítulo 3.

O último capítulo surge do esforço em isolar espécies de cianobactérias importantes na formação dos tapetes microbianos, que resultou no isolamento de uma cepa de *Anabaena* sp. Esta espécie foi, ao longo da tese, a principal formadora de tapetes microbianos da Lagoa dos Patos. Tendo em vista a grande importância de espécies heterocitadas na fixação de nitrogênio, conduziram-se experimentos na tentativa de entender a influência da salinidade, um dos principais fatores

determinadores de comunidades em estuários, sobre a atividade diazotrófica de *Anabaena* sp..

Os objetivos principais desta tese são registrar e caracterizar a ocorrência das comunidades de tapetes microbianos na Lagoa dos Patos (RS – Brasil), (2) relacionar a ocorrência e composição de tapetes microbianos com fatores meteorológicos importantes na hidrodinâmica do estuário; e (3) estudar o estresse e aclimação a diferentes salinidades de *Anabaena* sp., uma cepa de cianobactéria heterocitada isolada de um tapete microbianos da região estuarina da Lagoa dos Patos (RS – Brasil).

A tese aborda fatores que são determinantes para ocorrência e distribuição de comunidades intertidais de estuários, tais como hidrodinâmica, dessecação, temperatura e salinidade. Estes fatores são promotores de erosão nas margens ou afetam o metabolismo dos organismos expostos aos mesmos. No entanto, por se tratar de uma comunidade adaptada a tal exposição nossa hipótese leva a crer que (1) os tapetes microbianos são formados por organismos adaptados às variações ambientais intrínsecas a uma região estuarina; (2) que apesar de sensíveis a erosão, os tapetes colaboram para a bioestabilização do sedimento; e (3) que uma cepa de uma espécie que ocorre ao longo de todo ano no estuário da Lagoa dos Patos deve estar adaptada a grande variação de salinidade.

Capítulo 2: Tapetes Microbianos da Lagoa dos Patos: primeira ocorrência, composição e estruturas erosionais

Resumo – Nas últimas décadas comunidades de tapetes microbianos têm sido descritas nos mais diversos ambientes do hemisfério Norte, enquanto que a escassez de relatos para o hemisfério Sul reflete a falta de estudos e grupos dedicados à este tipo de comunidade. O presente trabalho objetiva descrever comunidades de tapetes do estuário da Lagoa dos Partos (RS – Brasil) de acordo com seu local de ocorrência na zona intermareal, composição e estrutura, bem como o efeito de forçantes físicas na erosão destes. Foi utilizada microscopia óptica, Microscopia Eletrônica de Varredura e análise molecular para acessar a composição das comunidades, bem como análises de teor de clorofila-a, carboidrato e proteína, metabólitos que ao serem liberados pela comunidade aumentam a estabilidade do sedimento. Os tapetes microbianos ocorreram nas zonas supra e meso intermareal onde o sedimento era composto por mais de 90% de areia fina. Os efeitos da erosão foram observados através de registros erosionais nas estruturas sedimentares induzidas por microorganismos, especialmente observados na zona mesointermareal. Os tapetes microbianos apresentaram dominância principalmente de cianobactérias filamentosas heterocitadas ou não, e diatomáceas penadas. Ao todo 11 espécies apresentaram eventos de dominância, com destaque para *Anabaena sp.*, que apresentou 20 eventos de dominância e esteve presente em cerca de 90% das amostras. A composição do tapete foi afetada pela zona intermareal onde ele ocupa. Na zona intermareal superior os tapetes ficam menos expostos a erosão, e frequentemente associados à fanerógamas, possibilitando a ocorrência de comunidades mais complexas, estáveis e com maior teor de clorofila e proteína. Na zona intermareal mediana a comunidade de tapete fica exposta à forçantes físicas que aumentam a erosão, evidenciada pela observação das estruturas sedimentares induzidas por microorganismos e devido a maior influência espacial e temporal de água doce, apresentou maior abundância relativa de espécies de cianobactérias heterocitadas.

Palavras-chave: Tapetes Microbianos; Cianobactérias; Diatomáceas; Zona Intermareal; Erosão.

1. Introdução

Tapetes microbianos são comunidades bênticas tridimensionais, formadas por uma população microbiana metabolicamente diversa que coexiste e interage (Stal, 1995; Paerl & Yannarell, 2010). Cianobactérias e diatomáceas, que geralmente estão associadas às camadas mais superiores fóticas, são os principais grupos formadores e dominantes nestas comunidades. Após a colonização do tapete, estes organismos

permitem o surgimento e coexistência de outros microrganismos e seus metabolismos (Stal, 1995).

Os organismos que coexistem nestes tapetes são metabolicamente diversos e coexistem em poucos centímetros devido a separação física (tapetes que apresentam camadas distintas) ou temporal (ciclos metabólicos que funcionam somente durante o dia ou noite). Além das diatomáceas e cianobactérias, entre as quais algumas cianobactérias diazotróficas, os tapetes também abrigam bactérias autotróficas e heterotróficas, metanogênicas entre outros grupos (Stal, 1995).

A estrutura dos tapetes microbianos só é possível devido a características ambientais e o fluxo de energia entre as diferentes populações que compõem o tapete. O desenvolvimento inicial dos tapetes depende de um substrato estável e de um tempo suficiente para a comunidade se consolidar, que pode ser por volta de duas semanas (Stock & Ward, 1991; Schieber *et al.*, 2007; Stal, 2010). Após a consolidação de uma comunidade, a resistência do tapete à erosão aumenta devido à produção de exopolissacarídeos (EPS) ou pela formação de aglomerados de filamentos que aprisionam os grãos de sedimento (Riding, 2000; Noffke, 2001).

No entanto, condições ambientais extremas ou a intensa flutuação das condições meteorológicas também são importantes para a ocorrência de tapetes microbianos, geralmente associados a regiões intertidais (Stal *et al.*, 1985). As variações de intensidade de luz, temperatura, salinidade e disponibilidade de água geram condições extremas suficientes para evitar a herbivoria, fator limitante nos sedimentos inframareal ou mesmo no supramareal inferior (Thompson *et al.*, 2004; Stal, 2010).

Devido a este cenário de interações com fatores biológicos e físicos, os tapetes frequentemente apresentam estruturas sedimentares características chamadas de Estruturas Sedimentares Microbialmente Induzidas (MISS) (Noffke *et al.*, 2001), que

são registros da interação dos tapetes microbianos com os eventos meteorológicos recentes (Pan *et al.*, 2013).

Os tapetes microbianos vêm sendo exaustivamente estudados nas últimas décadas principalmente na Europa e América do Norte, mas estudos na América do Sul são ainda escassos (Severin & Stal, 2010). Nos últimos anos alguns trabalhos com tapetes microbianos na América do Sul têm sido publicados (Cuadrado & Pizani, 2007; Cuadrado *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2013; Cuadrado *et al.*, 2013), descrevendo comunidades que apesar de ocorrerem ao longo de todo ano, são sensíveis a processos meteorológicos, e atuam na bioestabilização do sedimento.

Segundo Severin *et al.* (2012) a análise molecular das sequencias 16S e nifH de comunidades microbianas é uma importante ferramenta de observação da composição de organismos procariontes e fixadores de nitrogênio. Com esta ferramenta não só é possível observar a composição da comunidade (Severin *et al.*, 2010) como também o efeito de gradientes como o de salinidade (Severin *et al.*, 2012).

A Lagoa dos Patos (RS – Brasil) é a maior laguna estrangulada do mundo (10360 km²) e está localizada sob o predomínio do clima temperado do Sul do Brasil. Seu eixo principal está coincidentemente orientado com o regime de vento dominante. Ventos nordeste dominam durante todo ano, mas com marcante ocorrência de vento leste durante o verão e sudoeste durante o inverno (Tomazelli, 1993). A bacia hidrográfica da Lagoa dos Patos compreende uma área de 200 km², com alta descarga pluvial durante o inverno e início da primavera e baixa descarga durante verão/outono, embora a variação de descarga de ano para ano possa variar consideravelmente.

Na região o vento nordeste domina durante todo ano, verão e primavera são caracterizados pela presença do vento leste enquanto inverno e outono apresentam ventos sudoeste. A média de vento se encontra entre 3 e 5 m s⁻¹ (Tomazelli, 1993). O

aporte de água dos efluentes está associado a precipitação em toda sua bacia hidrográfica, com maior descarga no fim do inverno, muito embora valores de precipitação possam apresentar grandes flutuações de um ano para outro (Möller et al. 2001; Marques & Möller 2008). A salinidade varia de 0 a 34 (Baumgarten 1987) principalmente influenciada pelo aporte de efluentes e ação dos ventos (Möller & Castaing 1999).

Apesar das variações de fatores químicos, físicos e geológicos do estuário da Lagoa dos Patos permitirem a ocorrência dos tapetes microbianos, estes ainda não foram descritos para a região. Portanto, o objetivo deste trabalho é registrar e caracterizar a ocorrência das comunidades de tapetes microbianos na Lagoa dos Patos (RS – Brasil).

2. Materiais e Métodos

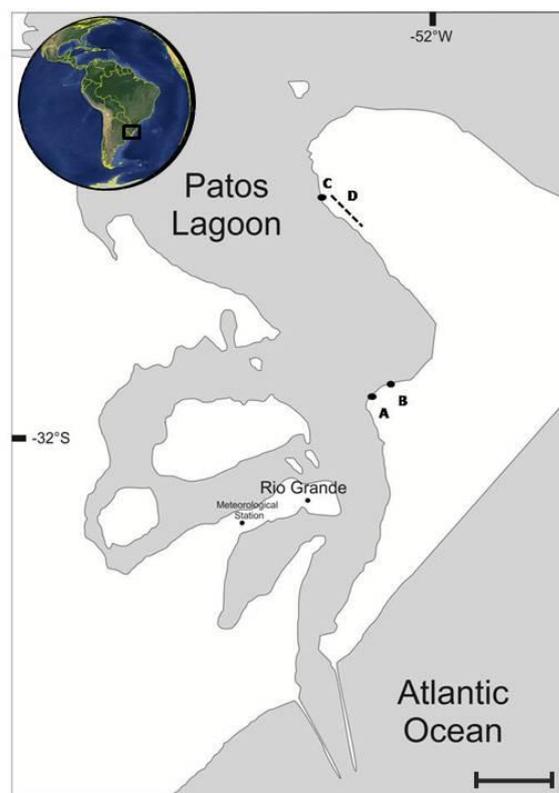


Figura 1. Mapa do Estuário da Lagoa dos Patos (RS-Brasil), com a localização dos pontos de coleta e da estação meteorológica. A, B, C e D: pontos e área de coleta. Escala = 5 km

2.1. Amostragem e Análises de Campo

A amostragem dos tapetes microbianos foi feita por busca visual na zona intermareal entre os pontos A e C, no estuário da Lagoa dos Patos (Fig.1) entre Novembro de 2012 e Julho de 2014. Durante este período a coleta procedeu de duas formas. A primeira foi de Novembro de 2012 até Janeiro de 2014, quando os tapetes foram coletados nos pontos A, B e C, selecionados por observações prévias pela acessibilidade e ocorrência de tapetes microbianos.

O segundo método de amostragem ocorreu de Janeiro de 2014 a Julho de 2014, quando os tapetes foram amostrados em intervalos variáveis ao longo de três quilômetros e meio na região D (Fig. 1). Toda esta região é caracterizada por pequenas baías de praia intercaladas por sedimento colonizado por fanerógamas, A vegetação superior a qual os tapetes estavam associados eram principalmente *Cyperus cf. minus*, *Cyperus cf. obtusatus*, *Bacopa monnieri*, *Hidrocotilis boraniensis* e *Juncus sp.*, comuns em locais freqüentemente alagados e com exposição a variação salina..

Durante este período amostras foram coletadas para análise de (1) composição da comunidade; (2) teor de clorofila *a*, carboidrato e proteína; (3) composição da comunidade de acordo com análises moleculares de sequências 16S e nifH.

Todas as amostras para análise da comunidade foram coletadas usando tubos Falcon® de 50 mL com boca de 2,8 cm de diâmetro. Para análise de granulometria foram coletadas amostras de 5 cm de profundidade junto ao tapete microbiano usando tubo acrílico com 15 cm de diâmetro.

A área de cobertura dos tapetes foi estimada utilizando fita métrica. Foram também analisadas salinidade, com refratômetro (Meji, Japan), e temperatura da água, com termômetro de mercúrio (Incoterm, Brazil). As amostras foram devidamente

processadas e conservadas dependendo da sua finalidade. Para contagem e identificação foi utilizada 0,5 cm superficiais das amostras, e fixados com 5 mL de solução Transeau (6:3:1 de água destilada, álcool e formalina). Os valores de área amostrada e volume de fixador foram utilizados para converter as contagens em células por centímetro quadrado (cel.cm^{-2}).

Foram coletadas 93 amostras de tapete na Lagoa dos Patos, sendo que de Novembro de 2012 até Janeiro de 2014 (fase 1) foram coletadas 54 amostras em 10 saídas de campo e de Janeiro de 2014 a Julho de 2014 (fase 2) foram coletadas 39 amostras em 7 saídas de campo. A relação de saídas de campo e número de amostras está detalhada na Tabela 1. Para as análises de clorofila a, carboidrato, proteína foram utilizadas 15 amostras da zona mesomareal, 5 de zona supramareal e 6 amostras de sedimento sem tapete para utilizar como referência. Durante a segunda fase os tapetes associados à água de afloramento subterrâneo foram encontrados apenas uma vez, e, portanto não foram considerados para as análises de clorofila a, carboidrato e proteína.

Durante as coletas foram observadas estruturas sedimentares microbianamente induzidas (MISS) que incluem características da superfície como superfícies deposicionais niveladas, estruturas em rugas, fragmentos de tapete e remanescentes erosionais (Noffke, 2001).

Para determinar teor de clorofila-*a*, proteína e carboidrato as amostras coletadas foram analisadas em três diferentes profundidades, com 0,5 cm de espessura cada uma, e foram chamadas de: L1, a camada superficial; L2, a camada intermediária; e L3, a camada mais profunda. Após coletadas as amostras foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até análise. As amostras para análise molecular foram mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise no

Departamento de Microbiologia Marinha do Royal Netherlands Institute for Sea Research (NIOZ – Yerseke - Zeeland).

2.2. Análises de Laboratório

2.2.1. Composição da comunidade por Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras fixadas em solução Transeau foram igualmente agitadas e quantificadas em campos aleatórios em câmara Utermohl 2 mL com aumento de 400x de acordo com Edler e Elbrächter (2010) e o resultado da contagem convertido para cél.cm^{-2} . Para identificação das diatomáceas foram preparadas lâminas permanentes segundo o método de Simonsen (1974) para observação e contagem de 200 valvas por amostra em 1000x. Foram consideradas dominantes aquelas espécies que apresentaram contagens de indivíduos (filamento, célula ou colônia) acima de 50 % de toda a comunidade.

A identificação dos táxons foi feita baseada em bibliografia especializada (Prescott *et al.*, 1975; Croasdale *et al.*, 1983; Komárek, 1983; Komárek and Fott, 1983; Parra *et al.*, 1983; Round 1990; Komárek and Anagnostidis, 1998; Komárek and Anagnostidis, 2005; Bicudo e Menezes, 2006; Komarek, 2013; Talgatti, 2014). Todos os táxons estão organizados de acordo com duas classificações. A abordagem Filogenética para algas eucariontes (Van den Hoek *et al.*, 1995) e cianobactérias (Komárek, 2005) foi usada para análises qualitativas e quantitativas. A segunda classificação aplicada foi a abordagem de Grupos Morfo-Funcionais (MFG) adaptada de Salmaso & Pádisak (2007) descrita em Guimarães *et al.* (2013), e foi utilizada apenas para análises quantitativas. Na abordagem MFG todos os organismos flagelados estão divididos em quatro grupos

Tabela 1. Relação de locais de coleta, número de amostras e análises nas fases 1 e 2 de coleta de tapetes microbianos na Lagoa dos Patos (RS – Brasil) entre Novembro de 2012 e Julho de 2014.

Data	Amostragem Fase 1			Análises	Amostragem Fase 2		Análises
	A	B	C		D		
2012	Nov	1	2	3	Contagens e granulometria		
	Dez	3	3	1	Contagens e granulometria		
2013	Jan				Contagens e granulometria		
	Fev				Contagens e granulometria		
	Mar				Contagens e granulometria		
	Abr	3	3	3	Contagens e granulometria		
	Mai			2	Contagens e granulometria		
	Jun	3	3	3	Contagens e granulometria		
	Jul			3	Contagens e granulometria		
	Ago	3			Contagens e granulometria		
	Set	3			Contagens e granulometria		
	Out				Contagens e granulometria		
	Nov				Contagens e granulometria		
	Dez	3			Contagens e granulometria		
2014	Jan	3	3	3	16	Contagens, análise molecular, Clorofila <i>a</i> , proteína e carboidrato	
	Fev				4	Contagens, análise molecular, Clorofila <i>a</i> , proteína e carboidrato	
	Mar				8	Contagens, análise molecular, Clorofila <i>a</i> , proteína e carboidrato	
	Abr				5	Contagens, Clorofila <i>a</i> , proteína e carboidrato	
	Mai				3	Contagens, Clorofila <i>a</i> , proteína e carboidrato	
	Jun				2	Contagens, Clorofila <i>a</i> , proteína e carboidrato	
	Jul				1	Contagens, Clorofila <i>a</i> , proteína e carboidrato	

Fase 1: Novembro de 2012 até Janeiro de 2014; Fase 2: Janeiro de 2014 a Julho de 2014; A, B, C e D: pontos de Coleta.

i) flagelados mixotróficos coloniais (CMF); ii) flagelados mixotróficos unicelulares (UMF); iii) flagelados autotróficos unicelulares (UAF); e iv) flagelados autotróficos coloniais (CAF). As cianobactérias estão divididas em heterocitadas (HCY), filamentosas não heterocitadas (FCY) e coloniais (CCY), enquanto as diatomáceas foram divididas em cêntricas (CDI) e penadas (PDI). As algas verdes autotróficas estão divididas em três grupos distintos: i) algas verdes cocóides e espécies unicelulares (GCU); algas verdes coloniais ou cenobiais (GCC); e iii) algas verdes filamentosas (GFI).

O MEV foi utilizado para auxiliar na identificação dos táxons e visualização da estrutura das comunidades. As amostras foram preparadas por filtração em filtro Nucleopore 25 mm (Whatman Inc., New Jersey, USA) seguido pela desidratação pela filtração em série de álcool em concentrações cada vez maiores (25%, 50%, 75%, 95%, 100% v/v) de acordo com Percopo *et al.* (2011). As amostras foram observadas em MEV Jeol JSM 6610LV, com cobertura de ouro (DentonVacuum DESK V), distância de trabalho 11 mm e Kv 20 no CEME-SUL da Universidade Federal do Rio Grande (FURG – Brasil).

2.2.2. Análises do Teor de Clorofila-*a*, Proteína e Carboidrato

As amostras para teor de clorofila-*a*, proteínas e carboidratos foram analisadas por métodos colorimétricos utilizando um Espectrofotômetro UV-Visible Cary 50 (Varian, Austrália). Clorofila-*a* foi analisada de acordo com Mackinney (1940), utilizando metanol para extração por 24 h a 5 °C no escuro. Após a extração as amostras foram centrifugadas (10.000 g) e o sobrenadante analisado em 665 nm e 750 nm.

A análise de proteína foi feita de acordo com Bradford (1976), utilizando NaOH 0,1 M para extração de proteínas durante 12 h a temperatura ambiente. As amostras extraídas foram centrifugadas, o reagente Bradford adicionado ao sobrenadante e

imediatamente analisado a 595 nm. Uma curva padrão de albumina foi utilizada para obter resultados em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A análise de carboidrato foi feita de acordo com o método do Fenol-Ácido Sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) utilizando Ácido Sulfúrico 1 M para extração de carboidratos em banho-maria por 1 h. as amostras extraídas foram centrifugadas e ao sobrenadante foi adicionado Fenol 0,5 % e ácido Sulfúrico concentrado. Após 30 min as amostras foram quantificadas colorimetricamente a 485 nm. Foi utilizada uma curva padrão de D(+) - glucose para obter resultados em mg. mL^{-1} .

2.2.3. Granulometria

O tamanho dos grãos de sedimento foi medido pelo método de peneiragem de material seco (Sugiuu, 1973). Os resultados foram expressos em percentual de intervalos de tamanho do grão de sedimento.

2.2.4. Análise Molecular

Para Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura (DGGE) foram utilizados 0,5 g de sedimento de amostras coletadas no Verão de 2014. O DNA de cada amostra foi isolado utilizando o Kit de Isolamento de DNA MO BIO PowerSoil® (MO-BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA) de acordo com as instruções de uso. A qualidade e quantidade de DNA extraído foi verificada em eletroforese com gel 2% Agarose e utilizando espectrofotômetro NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE).

Para o DNA extraído das amostras de tapete a seqüência do gene 16S rRNA foi amplificada utilizando os *primers* 8F (5'-AGA GTT TGATCM TGG CTC AG-3') /1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Weisburg *et al.*, 1991). Para a amplificação do *nifH* foi realizado um PCR em nuvem com os *primers* internos *nifH*-for

A (5'-GCI ATI TAC GGC AAA GGT GG -3') e nifH-rev (5'-GCG TAI ACG GCC ATC ATC TC-3') (Zehr & McReynolds, 1989) e os *primers* externos nifH-for B (5'- G GI TGT GAT CCT AAA GCC GA-3') e nifH-rev (o mesmo usado na primeira reação). As condições do PCR e processo da DGGE foram realizados de acordo com Severin *et al.* (2010). Os resultados foram obtidos em Unidades Operacionais Taxonômicas (OTUs).

2.2.5. Análise Estatística

Os índices de diversidade foram calculados usando Past 3.x, e foram utilizados para comparar os tapetes microbianos de acordo com a densidade, abundância, Índice Shannon e Riqueza.

Os resultados de teor de clorofila *a*, carboidratos e proteínas nas três diferentes profundidades foram analisados estatisticamente de duas formas. Primeiramente comparando os resultados de cada análise nas diferentes profundidades e posteriormente comparando a mesma camada em tapetes associados à fanerógamas, sedimento colonizado apenas pelo tapete e sedimento não colonizado pelo tapete. Para isto foram feitas ANOVA com teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5%.

Para comparar a composição de diferentes amostras de tapetes microbianos durante Janeiro de 2014 foi feita uma Análise Cluster usando Método não-ponderado de agrupamento aos pares (UPGMA) e índice de Jaccard no Past 3.x. Para a Análise Cluster dos resultados de análise molecular foi também utilizado UPMGA mas com Correlação de Pearson no Bio Numerics 6.6.

3. Resultados

Nos pontos A e B os tapetes ocorrem principalmente associados à fanerógamas. No ponto C os tapetes ocorreram associados ao sedimento com ou sem fanerógamas. As

amostras deste ponto foram utilizadas para analisar composição da comunidade e granulometria do sedimento. Quando encontrados, foi possível classificar os tapetes microbianos em: (I) associados ao sedimento na zona mesomareal; e (II) associados às fanerógamas ou (III) à água de afloramento subterrâneo na zona supramareal. (Fig. 2). A análise dos resultados, bem como a discussão foram escritas com foco na comparação entre estes três tipos de tapetes resgistrados.

Os tapetes microbianos foram encontrados na zona intermareal mediana e superior cobrindo desde poucos metros quadrados até 3400 m². Na zona intermareal mediana os tapetes microbianos ocorreram principalmente associados ao sedimento não colonizado por fanerógamas. Na zona intermareal superior ele ocorreu associado ao sedimento colonizado por fanerógamas ou ao afloramento de água subterrânea, com salinidade próxima a zero (Fig. 2). A análise de granulometria mostra que o sedimento na zona intermareal apresenta mais de 96 % de sedimento arenoso fino a médio (Fig. 3).

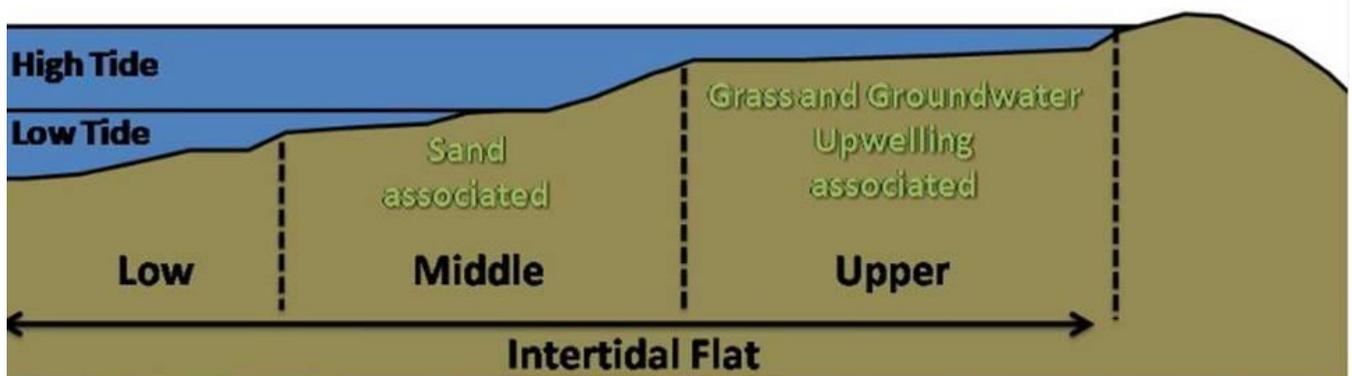


Figura 2. Distribuição dos tapetes microbianos na zona intermareal da Lagoa dos Patos (RS – Brasil). Adaptado de Abed *et al.* (2010)

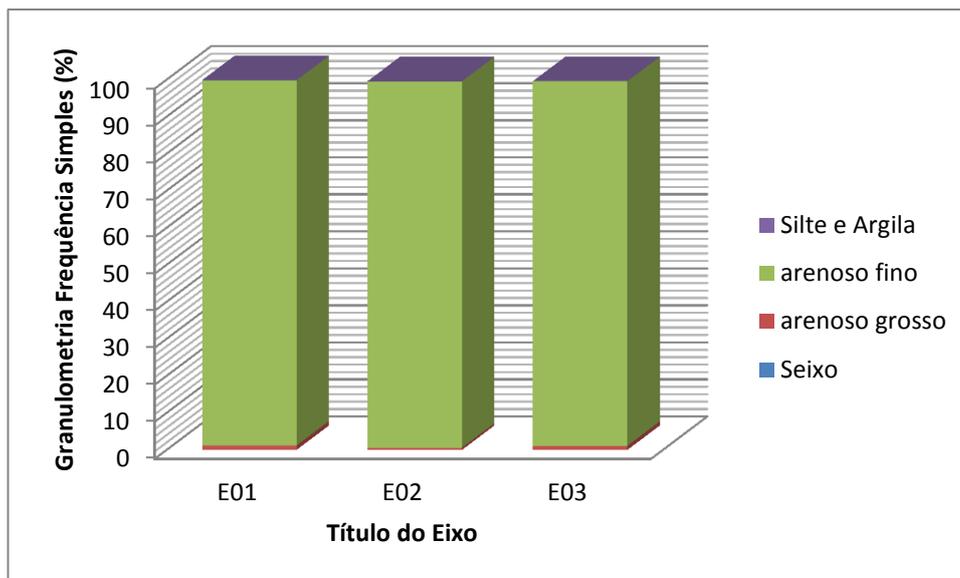


Figura 3. Granulometria dos pontos de coleta A (n=11), B (n=11) e C (n=11) na Lagoa dos Patos (RS – Brasil) entre Novembro de 2012 e Julho de 2014.

Os tapetes microbianos se apresentaram como uma rede intrincada de filamentos que por vezes não permitia a visualização do sedimento ou formando uma matriz de metabólitos na qual os grãos de sedimento estavam emersos. As MISS relacionadas à bioestabilização foram observadas exclusivamente nos tapetes associados à região intermareal mediana, onde a exposição a erosão foi maior, e incluíram estruturas deposicionais niveladas, remanescentes erosionais, fragmentos de tapetes flutuando na coluna d'água, bem como bolhas fotossintéticas (Fig. 4).

Foram identificadas 103 espécies de algas e cianobactérias compondo as comunidades de tapetes (Tab. 2). O grupo taxonômico com maior número de espécies foi Bacillariophyceae (39,8 %), seguido por Cyanobacteria (24,27 %), Chlorophyceae (19,41 %), Zygnematophyceae (12,62 %) e outros (3,8 %). De acordo com a classificação morfofuncional, as diatomáceas penadas foram o grupo com o maior número de espécies, com 30,1 %; seguido de algas verdes coloniais (14,56 %); diatomáceas cêntricas (9,71 %); cianobactérias filamentosas, cianobactérias coloniais e

algas verdes cocóides (8,73 % cada); algas verdes filamentosas (7,76 %); cianobactérias heterocitadas (6,78 %); e outros (4,9 %).

Entre as espécies mais frequentes em todas as amostras coletadas entre Novembro de 2012 e Julho de 2014 nos três pontos de coleta (n:54) está *Anabaena* sp., uma cianobactéria heterocitada que ocorreu em 91,49 % das amostras, seguida por *Nitzschia palea* (86,17 %), *Pinnularia gibba* (64,89 %), *Planktolyngbya limnetica* (62,77 %), *Eunotia cf. bilunaris* (57,45 %), *Nitzschia adamata* (50%). Onze espécies apresentaram eventos de dominância numérica (Tab. 2), dentre estas *Anabaena* sp. apresentou vinte eventos de dominância, atingindo abundância relativa máxima de 90,22 % em um destes eventos. As outras espécies que também apresentaram eventos de abundância foram: *Cylindrospermum licheniforme* (80,23 %), *Planktolyngbya limnetica* (89,76 %), *Quadrigula* sp. (77,6 %), *Oscillatoria cf. princeps* (75,47 %), *Pinnularia gibba* (74,68 %), *Pseudanabaena catenata* (67,09 %), *Geminella interrupta* (64,46 %), *Nitzschia palea* (56,89 %), *Cosmarium* sp.2 (51,96 %) e *Cryptomonas* sp. (51,41 %).

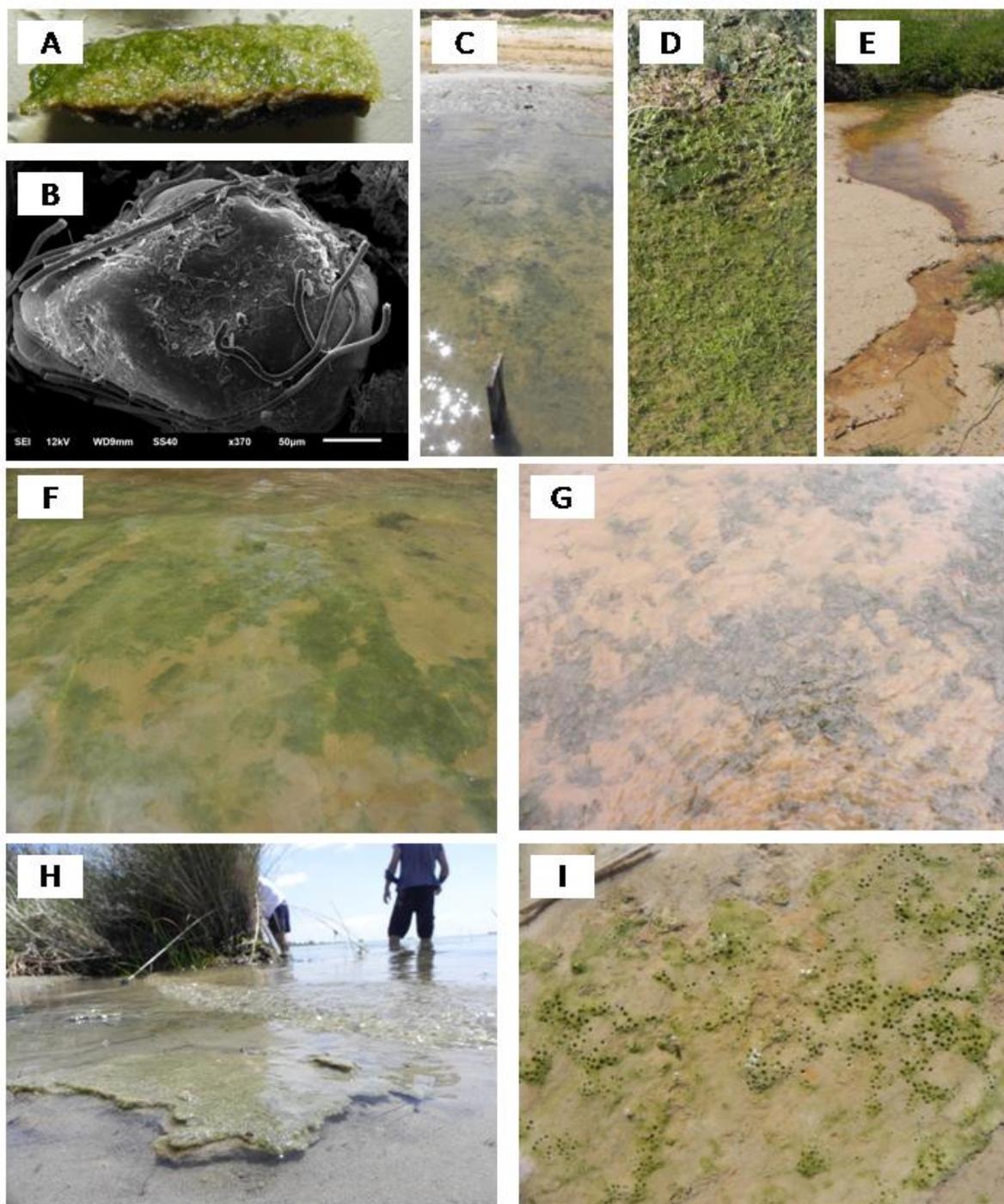


Figura 4. Detalhe da superfície do sedimento colonizado por um tapete microbiano (A); Microscopia eletrônica de varredura da comunidade de tapete aderida a um grão de sedimento (B). Tipos de tapetes encontrados na Lagoa dos Patos: associado ao sedimento na zona intermareal mediana (C), associado às fanerógamas (D) e ao afloramento de água subterrânea (E) na zona intermareal superior. Estruturas sedimentares induzidas por microorganismos (MISS) observadas em tapetes da Lagoa dos patos: superfície deposicional nivelada fragmentada por bolsões de erosão (F), fragmentos de tapete microbiano flutuando após evento de erosão (G), remanescentes erosionais (H) e superfície marcada por pequenas cavidades formadas por bolhas fotossintéticas.

Tabela 2. Lista de espécies de cianobactérias e microalgas encontradas em tapetes microbianos no estuário da Lagoa dos Patos (RS – Brasil)

MFG	CYANOBACTERIA	Freq. (%)	ED	ARM	Pontos de Coleta			
					A	B	C	D
Chroococcales								
CCY	<i>Aphanocapsa</i> cf. <i>grevillei</i> (Berkeley) Rabenhorst	23,40	0	33,78	x	x	x	
CCY	<i>Aphanothece stagnina</i> (Sprengel) Braun	23,40	0	3,28	x	x	x	x
CCY	<i>Chroococcus minor</i> (Kützing) Nägeli	9,57	0	0,92				x
CCY	<i>Chroococcus turgidus</i> (Kützing) Nägeli	21,28	0	8,54	x	x	x	x
CCY	<i>Chroococcus dispersus</i> (Keissler) Lemmermann	1,06	0	0,43		x		
CCY	<i>Merismopedia glauca</i> (Ehrenberg) Kützing	47,87	0	22,43	x	x	x	x
CCY	<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing	10,64	0	4,93			x	x
CCY	<i>Microcystis</i> sp.	3,19	0	0,37			x	x
CCY	<i>Microcrocis pulchella</i> (Buell) Geitler	11,70	0	0,69		x	x	x
Nostocales								
HCY	<i>Cylindrospermum licheniforme</i> Kützing ex Bornet & Flahault	13,83	5	80,23	x	x	x	
HCY	<i>Gloeotrichia natans</i> Rabenhorst ex Bornet et Flahault	22,34	0	20,65	x	x	x	x
HCY	<i>Hapalosiphon</i> cf. <i>arboreus</i> West & West	4,26	0	4,55	x	x	x	
HCY	<i>Mastigocladus</i> sp.	4,26	0	3,57	x	x		
HCY	<i>Mastigocladus</i> sp2	10,64	0	75,00	x	x		x
HCY	<i>Scytonema</i> cf. <i>coactile</i> Montagne ex Bornet & Flahault	8,51	0	13,25	x	x	x	
HCY	<i>Anabaena</i> sp.	91,49	20	90,22	x	x	x	x
Oscillatoriales								
FCY	<i>Leptolyngbya cebennensis</i> (Gomont) I.Umezaki & M.Watanabe	19,15	0	49,35	x	x	x	x
FCY	<i>Oscillatoria</i> cf. <i>princeps</i> Vaucher ex Gomont	48,94	7	75,47	x	x	x	x
FCY	<i>Phormidium natans</i> (Gomont) Senna & Compère	6,38	0	48,83	x	x	x	
FCY	<i>Planktolyngbya contorta</i> (Lemmermann) Anagnostidis & Komárek	4,26	0	7,61	x		x	

Continuação:

FCY	<i>Planktolingbya limnetica</i> (Lemmermann) Komárková-Legnerová & Cronberg	62,77	1	89,77	x	x	x	x
FCY	<i>Spirulina laxissima</i> West	2,13	0	1,13	x			
Pseudanabaenales								
FCY	<i>Geitlerinema amphibium</i> (Agardh ex Gomont) Anagnostidis	3,19	0	1,50	x			x
FCY	<i>Pseudanabaena catenata</i> Lauterborn	39,36	2	67,10	x	x	x	x
FCY	<i>Pseudanabaena</i> sp.	3,19	0	8,72	x			
BACILLARIOPHYCEAE								
Centrales								
CDI	<i>Amphiprora</i> sp.	5,32	0	1,78		x		x
CDI	<i>Aulacoseira granulata</i> var. <i>angustissima</i> (O.F.Müller) Simonsen	1,06	0	1,02				x
CDI	<i>Cerataulina bergonii</i> (H.Peragallo) Schütt	10,64	0	4,36				x
CDI	<i>Chaetocerus</i> sp.	1,06	0	0,75				x
CDI	<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kützing	19,15	0	3,44		x	x	x
CDI	<i>Melosira varians</i> C.Agardh	47,87	0	8,05	x	x	x	x
CDI	<i>Melosira moniliformis</i> (Müller) Agardh	4,26	0	1,91			x	x
CDI	<i>Pleurosigma</i> sp.	4,26	0	0,82				x
CDI	<i>Skeletonema</i> sp.	23,40	0	10,68		x		x
CDI	<i>Terpsinoë americana</i> (Bailey) Grunow	4,26	0	0,79	x		x	x
Pennales								
PDI	<i>Achnantheidium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	1,06	0	1,09	x	x		x
PDI	<i>Amphora veneta</i> Kützing	4,26	0	2,67				x
PDI	<i>Capartogramma crucicula</i> (Grunow) Ross	41,49	0	26,59	x	x	x	x
PDI	<i>Diadesmis confervacea</i> Kützing	36,17	0	9,49	x	x	x	x
PDI	<i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch) Mann	34,04	0	8,31	x	x	x	x
PDI	<i>Encyonema</i> sp.	21,28	0	4,45			x	x
PDI	<i>Eunotia</i> cf. <i>bilunaris</i> (Ehrenberg) Schaarschmidt	57,45	0	9,11	x	x	x	x

Continuação:

PDI	<i>Fallacia</i> sp.	20,21	0	3,32	x	x	x	x
PDI	<i>Fragillaria</i> sp.	30,85	0	24,63	x	x	x	
PDI	<i>Gomphonema gracile</i> Ehrenberg	5,32	0	1,47		x	x	x
PDI	<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing	4,26	0	1,47	x			x
PDI	<i>Hantzschya</i> sp.	1,06	0	0,69				x
PDI	<i>Hippodonta</i> sp.	8,51	0	1,45				x
PDI	<i>Navicula cryptotenella</i> Lange-Bertalot	40,43	0	26,47	x	x	x	x
PDI	<i>Navicula</i> sp.	46,81	0	30,27	x	x	x	x
PDI	<i>Navicula</i> sp. 2	4,26	0	11,00				x
PDI	<i>Nitzschia adamata</i> Hustedt	50,00	0	14,24	x	x	x	x
PDI	<i>Nitzschia clausii</i> Hantzsch	5,32	0	7,33				x
PDI	<i>Nitzschia frustulum</i> (Kützing) Grunow	11,70	0	10,44	x	x		x
PDI	<i>Nitzschia gandersheimiensis</i> Krasske	3,19	0	2,90	x	x		
PDI	<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) Smith	86,17	2	56,89	x	x	x	x
PDI	<i>Nitzschia reversa</i> Smith	13,83	0	9,04		x	x	x
PDI	<i>Pinnularia acrosphaeria</i> Smith	20,21	0	7,92	x	x	x	x
PDI	<i>Pinnularia gibba</i> Ehrenberg	64,89	2	74,69	x	x	x	x
PDI	<i>Placoneis abundans</i> Metzeltin, Lange-Bertalot & García-Rodríguez	2,13	0	1,59				x
PDI	<i>Planothidium frequentissimum</i> (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot	4,26	0	0,75		x	x	x
PDI	<i>Pleurosira laevis</i> (Ehrenberg) Compère	15,96	0	4,31	x	x	x	x
PDI	<i>Rhopalodia brebissonii</i> Krammer in Lange-Bertalot & Krammer	17,02	0	2,89		x	x	x
PDI	<i>Rhopalodia gibba</i> (Ehrenberg) Müller	4,26	0	1,70		x	x	
PDI	<i>Trepidoneis lepidoptera</i> var. <i>minor</i> Cleve	2,13	0	4,83		x	x	
PDI	<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) P.Compère	28,72	0	7,11	x	x	x	x

Continuação:

CHLOROPHYTA							
Chlorophyceae							
Chaetophorales							
GFI	<i>Binuclearia</i> sp.	1,06	0	3,57	x		
GFI	<i>Geminella interrupta</i> Turpin	13,83	1	64,46	x	x	x
GCU	<i>Schroederia</i> cf. <i>setigera</i> (Schröder) Lemmermann	3,19	0	2,56	x		x
GFI	<i>Ulothrix zonata</i> (Weber & Mohr) Kützing	15,96	0	18,08	x	x	x
Chlamydomodales							
CAF	<i>Volvox</i> sp.	6,38	0	0,37		x	x
Sphaeropleales							
GCC	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda sensu Kors.	7,45	0	4,16		x	x
GCC	<i>Asterococcus limneticus</i> Smith	2,13	0	23,86		x	x
GCC	<i>Coelastrum sphaericum</i> Nägeli	3,19	0	1,25	x	x	
GCC	<i>Coelastrum</i> sp.	3,19	0	0,44	x		x
GCC	<i>Crucigenia</i> sp.	4,26	0	4,17	x	x	
GCC	<i>Desmodesmus</i> cf. <i>quadricauda</i> (Turpin) Hegewald	6,38	0	2,24			x
GCC	<i>Dictyosphaerium elongatum</i> Hindák	15,96	0	24,50	x	x	x
GCC	<i>Dimorphococcus lunatus</i> Braun	1,06	0	0,30			x
GCC	<i>Eutetramorus fotti</i> (Hindák) Komarek	15,96	0	4,58	x	x	x
GCC	<i>Gloeocystis</i> sp.	10,64	0	16,84	x	x	x
GCC	<i>Quadrigula</i> sp.	11,70	2	77,60		x	x
GCC	<i>Scenedesmus acuminatus</i> (Lagerheim) Chodat	47,87	0	26,38	x	x	x
GCC	<i>Scenedesmus</i> sp.	14,89	0	5,98		x	x
GCC	<i>Westella botryoidea</i> (West) De Wildeman	5,32	0	58,12		x	

Continuação:

Ulvophyceae							
GFI	<i>Ulva</i> sp.	4,26	0	1,57	x	x	
Zygnematophyceae							
Desmidiáles							
GCU	<i>Closterium</i> cf. <i>libellula</i> Focke ex Nordstedt	7,45	0	13,76	x		x
GCU	<i>Closterium</i> cf. <i>parvulum</i> Nägeli	22,34	0	17,84	x	x	x
GCU	<i>Closterium</i> <i>setaceum</i> Ehrenberg ex Ralfs	4,26	0	3,54	x	x	x
GCU	<i>Cosmarium</i> cf. <i>margaritatum</i> (Lundell) J.Roy & Bisset	10,64	0	9,81	x	x	x
GCU	<i>Cosmarium</i> sp.	19,15	0	5,06	x	x	x
GCU	<i>Cosmarium</i> sp. 2	26,60	1	51,96	x	x	x
GCU	<i>Euastrum</i> sp.	15,96	0	1,52	x	x	x
GCU	<i>Staurastrum</i> cf. <i>dilatatum</i> Ehrenberg ex Ralfs	2,13	0	0,30	x		x
Zygnematales							
GFI	<i>Mougeotia</i> sp.	3,19	0	17,25		x	
GFI	<i>Oedogonium</i> sp.	28,72	0	4,07	x	x	x
GFI	<i>Onychonema</i> sp.	1,06	0	0,58			x
GFI	<i>Spondylosium</i> sp.	1,06	0	0,53	x		
GCC	<i>Zygnema</i> sp.	6,38	0	19,59	x	x	x
CRYPTOPHYTA							
UMF	<i>Cryptomonas</i> sp.	4,26	1	51,42	x	x	
EUGLENOPHYTA							
UMF	<i>Euglena</i> sp.	29,79	0	22,73	x	x	x
UMF	<i>Phacus</i> sp.	3,19	0	0,52	x	x	x
UMF	<i>Trachelomonas</i> sp.	8,51	0	1,57	x	x	

Freq (%): percentual de amostras nas quais cada táxon ocorreu; ED: número de amostras nas quais cada táxon apresentou-se como dominante; ARM: Abundância Relativa Máxima; A, B, C e D: pontos de amostragem; X: locais onde a espécie ocorreu.

Os três diferentes tipos de tapetes apresentaram composições taxonômicas semelhantes, com mais de 95% da comunidade representada por Cyanobacteria e Bacillariophyceae (Fig. 5-A). As cianobactérias foram representadas principalmente por filamentosas heterocitadas ou não, mas com maior percentual de heterocitadas em tapetes associados ao afloramento de água subterrânea. As diatomáceas penadas representam a maioria das Bacillariophyceae, e as algas verdes cocóides são as principais representantes de Chlorophyceae (Fig.5-B).

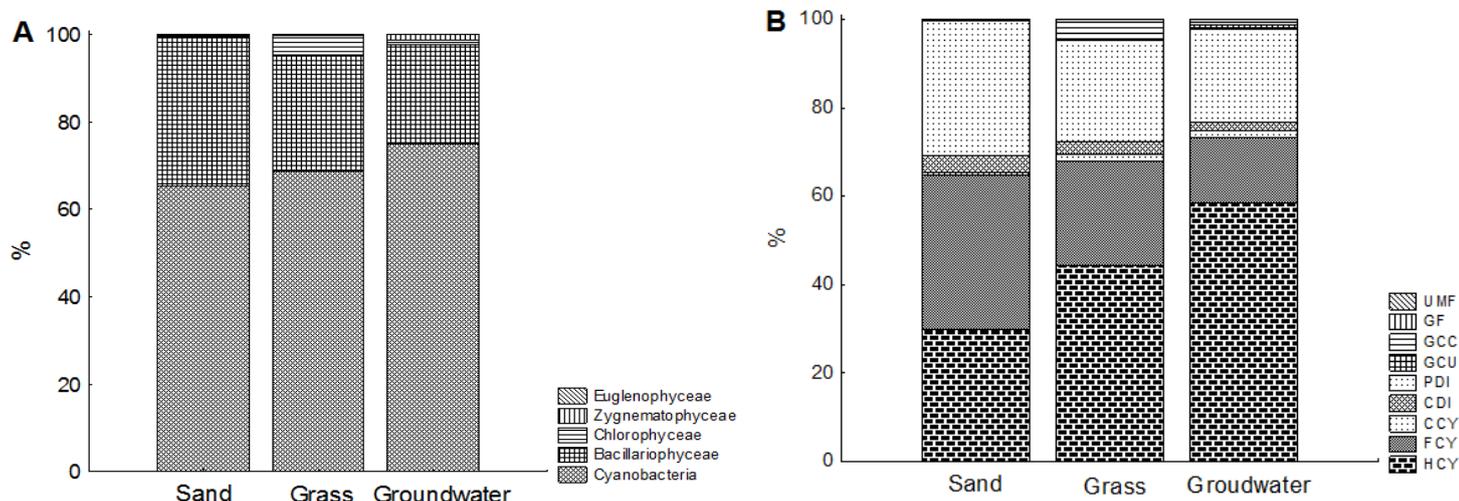


Figura 5. Abundância Relativa das cinco principais táxons e de seus grupos morfofuncionais nos tapetes microbianos associados ao sedimento na região intermareal mediana (Sand; n=12), a vegetação rasteira de margem (Grass n=13) e ao afloramento de água subterrânea (Groundwater; n=3) na zona intermareal superior do estuário da Lagoa dos Patos (RS – Brasil) de acordo com a abordagem Filogenética (A) e de Grupos Morfo-Funcionais (B). flagelados mixotróficos unicelulares (UMF); flagelados autotróficos coloniais (CAF); cianobactérias filamentosas (FCY), heterocitadas (HCY) e coloniais (CCY); diatomáceas cêntricas (CDI) e penadas (PDI); algas verdes cocóides e unicelulares (GCU); algas verdes coloniais ou cenobiais (GCC); e algas verdes filamentosas (GFI).

O tapete mesomareal apresentou maior variação da densidade celular do que os tapetes associados a vegetação. A média da densidade dos tapetes intertidais ficou próxima de 160.000 cél.cm², mas chegou a atingir valores próximos a 400.000 células.cm² (Fig. 6-A). Os valores de dominância e Índice Shannon foram semelhantes

(Fig. 6-B e 6-C). Ponderando-se o tempo de estudo, tapetes associados à fanerógamas apresentaram maior riqueza de táxons, enquanto tapetes associados a areia apresentaram maior amplitude de variação, com eventos pontuais de alta e baixa riqueza (Fig. 6-D).

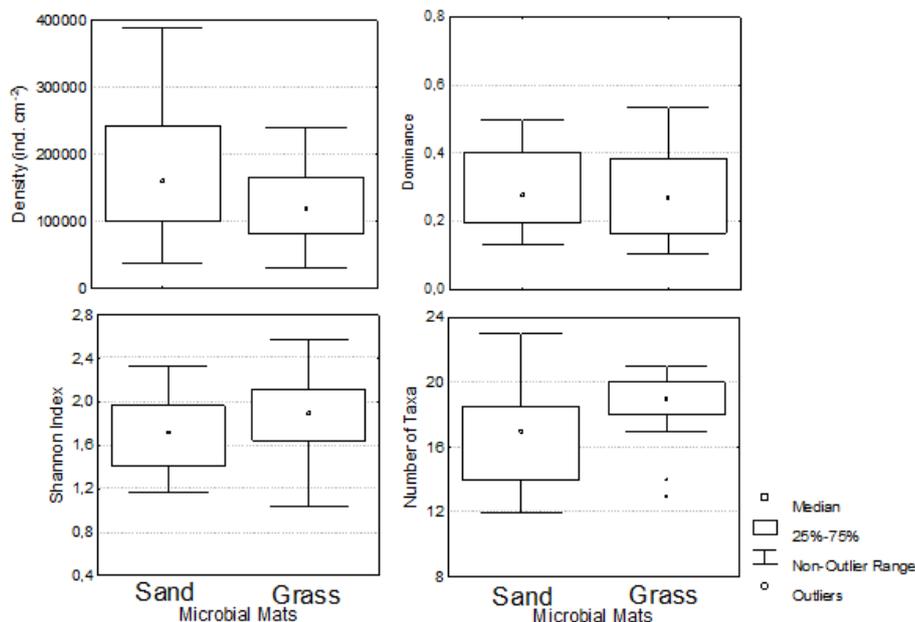


Figura 6. Densidade celular (A), Índices de dominância (B), Shannon (C) e Número de táxons da camada superficial (5mm) dos tapetes microbianos associados ao sedimento na zona intermareal mediana (Sand; n=15) e a vegetação na zona intermareal superior (Grass; n=5) sedimento no estuário da Lagoa dos Patos (RS - Brasil) de Janeiro a Julho de 2014.

A Análise de Similaridade entre tapetes coletados em um mesmo dia em janeiro de 2014 agrupou a abundância e composição das comunidades de acordo com a distribuição destes na zona intermareal. A composição da comunidade dos tapetes intertidais apresentou similaridade menor que 0,48 em relação aos tapetes associados às fanerógamas. Tapetes microbianos associados ao sedimento apresentaram maior similaridade entre si (Fig. 7-C), bem como uma maior dominância de 3 a 4 espécies, *Anabaena* sp., *P. limnetica*, *N. palea* e *Navicula* sp. (Fig. 7-B). Em tapetes associados à fanerógamas é possível perceber um pequeno aumento da riqueza (Fig. 7-A), principalmente com outras espécies de cianobactérias (e.g. *Lyngbya cabennensis*), diatomáceas (*Pinnularia gibba*, *P. catennata* e *Skeletonema* sp.) e algas verdes (*Scenedesmus accuminatus*).

Os perfis de clorofila *a*, carboidrato e proteína para os tapetes intertidais associados ou não a vegetação (*Grass*) e sedimento (*Sand*) e sem comunidades em geral (No Mat) apresentaram valores médios maiores na camada mais superficial de sedimento do que nas camadas inferiores (Fig. 8). Os tapetes microbianos apresentaram valores de clorofila *a*, proteína e carboidrato na camada superficial significativamente maiores do que na segunda e terceira camada (Fig. 8-A, B, C, D, E e F). Considerando os valores de médios de clorofila e proteína no sedimento, com tapete e sem tapete, apenas a camada superficial dos tapetes foi significativamente maior do que no sedimento sem tapete (Fig. 8-A, B, D, E, G e H). As análises de carboidrato não apresentaram diferenças significativas entre sedimento com ou sem tapete (Fig. 8-C, F e D).

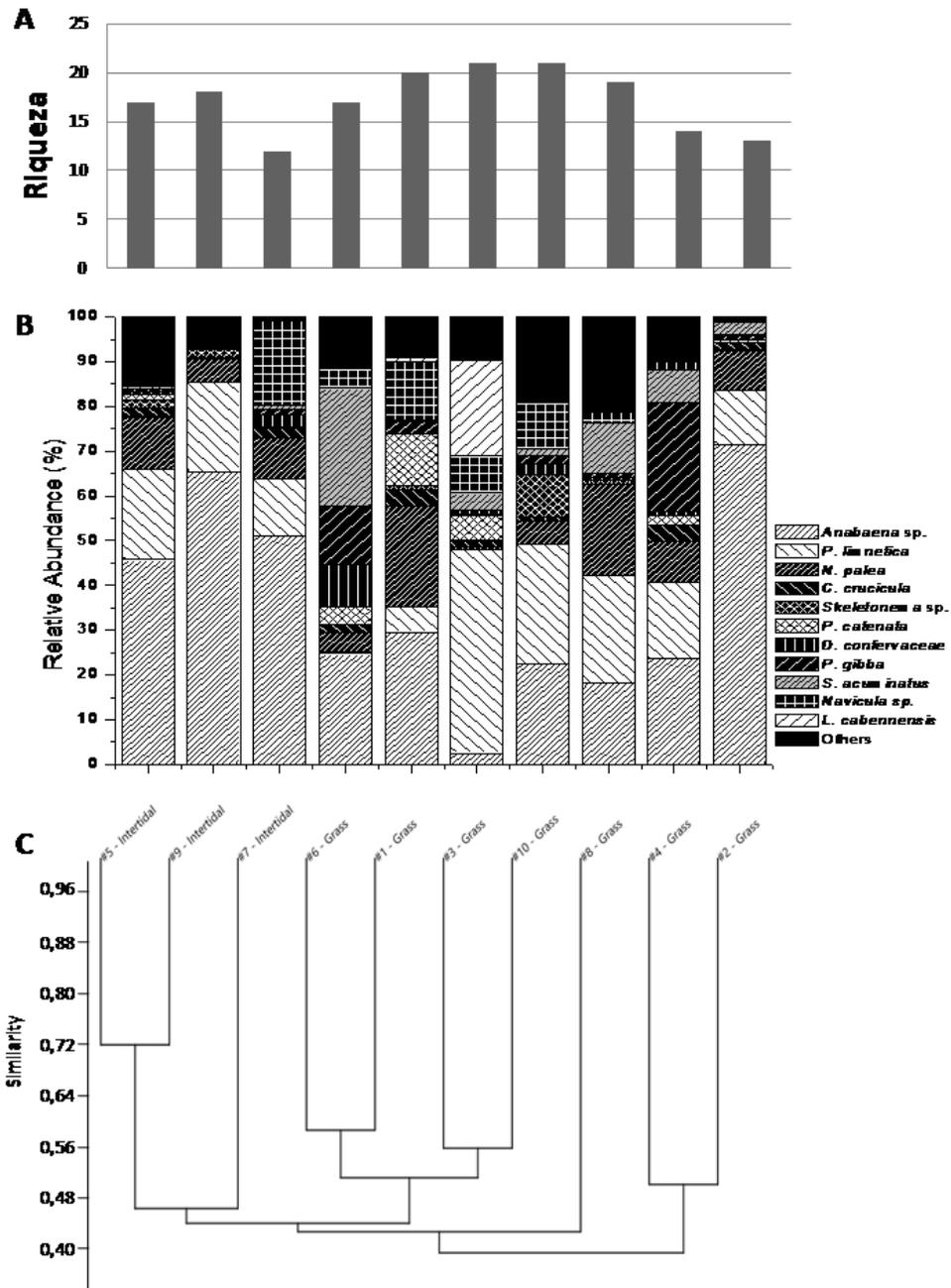


Figura 7. Riqueza (A), abundância relativa de espécies (B) e análise de similaridade (C) de tapetes microbianos coletados em janeiro de 2014 no estuário da Lagoa dos Patos (RS-Brasil).

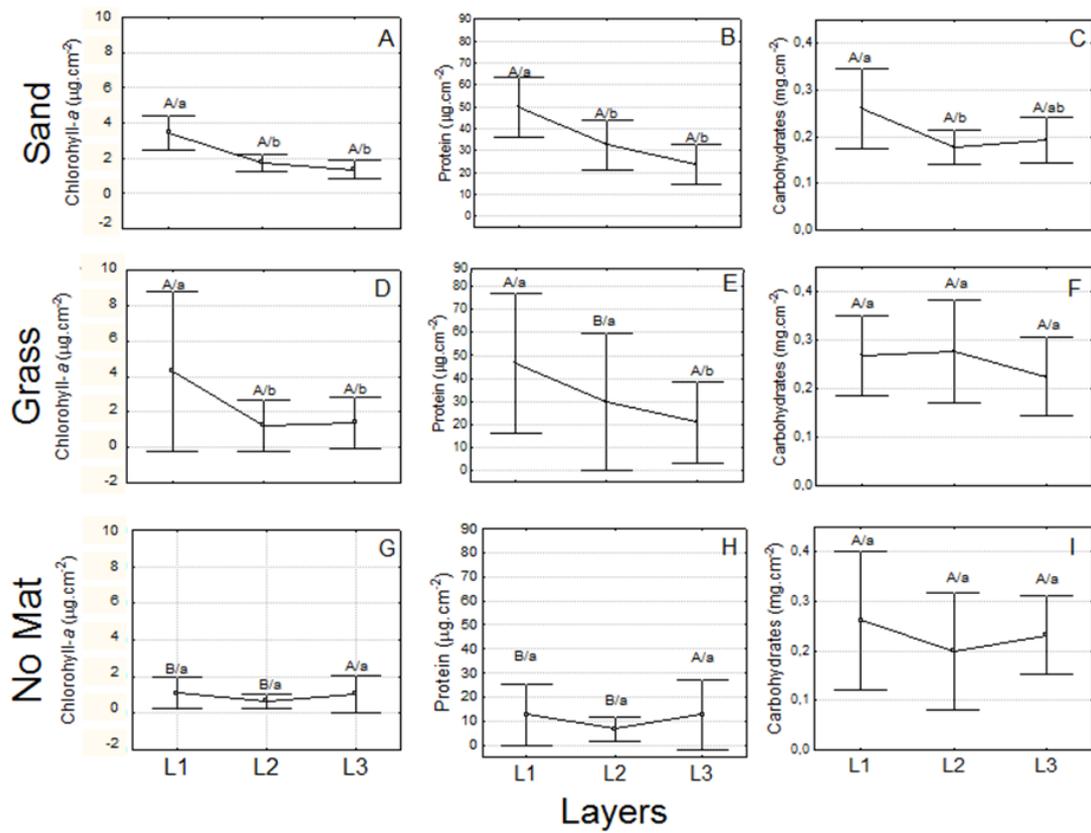


Figura 8. Análise do teor de clorofila *a*, proteína e carboidratos em três diferentes camadas dos tapetes microbianos do Estuário da Lagoa dos Patos (RS – Brasil) associados ao sedimento na zona mesomareal (sand; n=15), associados à fanerógamas na zona supramareal (Grass; n=5) e do sedimento não colonizado pela comunidade de tapete (No Mat; n=6). L1: camada superior entre 0 e 0,5 cm; L2: camada intermediária entre 0,5 e 1 cm; L3: camada inferior entre 1 e 1,5 cm. ANOVA com teste de Kruskal-Wallis (letra maiúscula para comparação entre tipos de tapete e letra minúscula para comparação entre camadas; p<0,05)

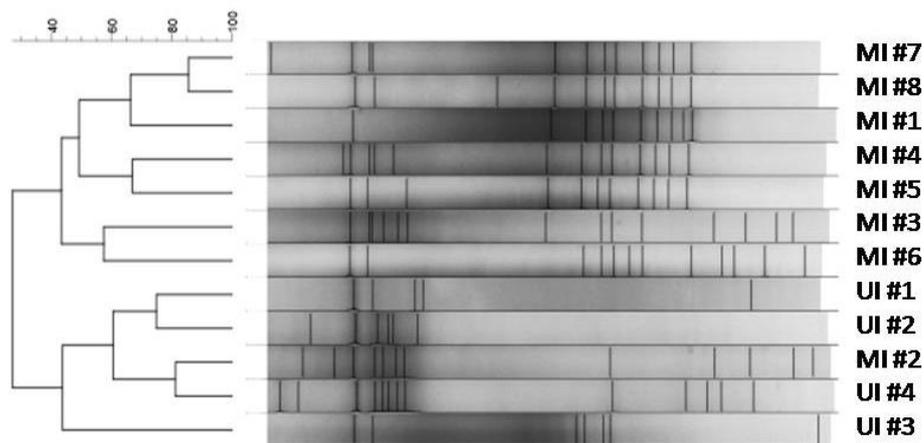


Figura 9. Análise DGGE para genes 16S de amostras de tapetes microbianos coletadas durante o verão de 2014 na Lagoa dos Patos (Brasil – RS). MI: tapetes da zona mesomareal; UI: tapetes da zona supramareal.

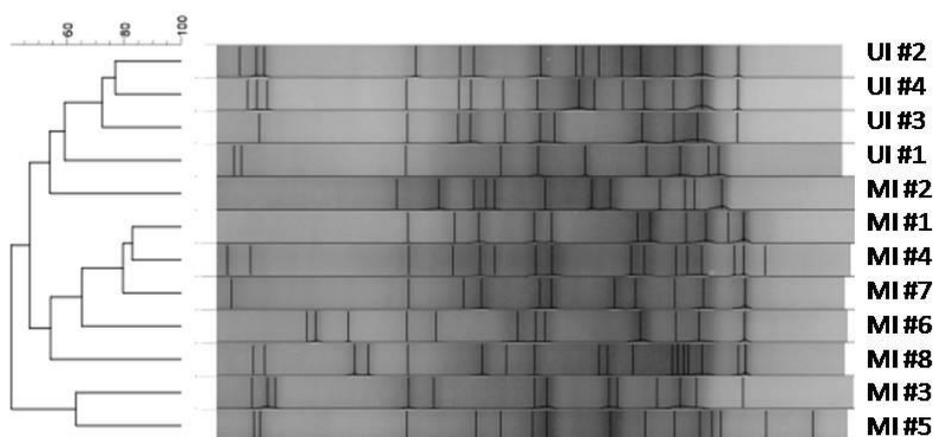


Figura 10. Análise DGGE para genes nifH de amostras de tapetes microbianos coletadas durante o verão de 2014 na Lagoa dos Patos (Brasil – RS). MI: tapetes da zona mesomareal; UI: tapetes da zona supramareal.

As análises DGGE para os genes 16S (Fig. 9) e nifH (Fig. 10) resultaram no agrupamento das amostras de acordo com o tapete onde foram coletadas. Apenas uma amostra da zona intermareal inferior mostrou maior similaridade com os tapetes da zona intermareal superior tanto para gene 16S quanto para nifH. As análises de diversidade utilizando as unidades taxonômicas operacionais não demonstraram nenhuma diferença significativa entre os grupos.

4. Discussão

A ocorrência de tapetes microbianos na Lagoa dos Patos está diretamente relacionada à hidrodinâmica local. Os tapetes encontrados durante o período de estudo ocorreram principalmente na zona intermareal mediana e superior, que apesar da grande exposição às condições meteorológicas, são locais de preferência dos tapetes devido ao menor impacto por organismos herbívoros (Stal, 2010). Na zona intermareal as flutuações de parâmetros ambientais são frequentemente ainda maiores do que na atmosfera ou na zona subtidal, criando fatores extremos múltiplos como hipersalinidade, temperaturas altas, exposição ao UV, dessecação e erosão (Abed *et al.*, 2008). Portanto, para formação dos tapetes microbianos as cianobactérias e algas eucarióticas necessitam apresentar grande flexibilidade quanto à flutuação de parâmetros ambientais.

As diatomáceas penadas foram o grupo que apresentou maior riqueza, enquanto as cianobactérias filamentosas foram dominantes. A maioria dos estudos com tapetes microbianos descreve estes dois grupos como os principais organismos colonizadores e formadores de tapetes para a maioria dos ambientes (Golubic *et al.*, 2000; Woelfel *et al.*, 2007; Cuadrado *et al.*, 2011), principalmente devido a capacidade de locomoção, produção de EPS e outros fatores associados a estabilização do sedimento (Noffke *et al.*, 2001). Os tapetes ocorreram associados ao sedimento arenoso fino, o que explica a alta abundância relativa de cianobactérias, pois costumam apresentar menor disponibilidade de nutriente, condições às quais cianobactérias estão bem adaptadas (Stal, 2010).

Após a colonização e estabilização do sedimento, organismos fotossintetizantes incapazes de se locomover começam a surgir, tal como cianobactérias cocóides e filamentosas fixadoras de nitrogênio, e algas verdes (Golubic *et al.*, 2000). No estuário da

Lagoa dos Patos esta sucessão ecológica reflete na maior dominância de cianobactérias filamentosas e diatomáceas penadas, apesar da grande riqueza de organismos sem motilidade, como as cianobactérias coloniais, diatomáceas cêntricas e algas verdes.

Foi possível observar um aumento gradual de cianobactérias heterocitadas nos tapetes da zona intermareal média para àqueles da zona intermareal superior. Alguns estudos mostram que o aumento da exposição à água salgada diminui a ocorrência de cianobactérias heterocitadas (Stal, 2009) e, portanto, dois fatores podem explicar a maior ocorrência de espécies heterocitadas na zona intermareal superior: (1) tapetes da zona intermareal média foram mais freqüentes no verão, quando ocorre a entrada de água salgada no estuário (como será discutido no próximo capítulo), e ficam mais expostos à água do estuário; e (2) tapetes da zona intermareal superior ocorrem durante todo o ano e recebem maior influência de água doce do estuário (especialmente nos meses mais frios), pluvial ou subterrânea.

Estes mesmos fatores influenciam também na ocorrência de algas verdes nos tapetes da zona intermareal superior, uma vez que as principais espécies de algas verdes com eventos de dominância são cocóides ou filamentosas sem locomoção e comuns em água doce (e.g. *Geminella interrupta* e *Cosmarium* sp.). A presença de espécies cêntricas de diatomáceas deve estar relacionada à colaboração da comunidade pelágica, pela deposição de organismo do fitoplâncton e adesão destes a matriz polissacarídica formada pelo tapete.

A zona intermareal superior caracterizou-se por fornecer menor exposição à água salgada e maior estabilidade aos tapetes, devido à proteção fornecida por fanerógamas (Gemerden, 1993; Grootjans *et al.*, 1997; Woelfel *et al.*, 2007; Stal 2010). Por outro lado, na zona intermareal mediana os tapetes estiveram mais expostos à erosão, de acordo com os registros de MISS, e variação de salinidade, uma vez que a região

supramareal costuma receber maior aporte pluvial. Isto refletiu na maior ocorrência de registros de erosão na zona intermareal mediana. Estes tapetes apresentaram-se frequentemente fragmentados com bolsões erodidos onde o sedimento não coberto pelo tapete apresentava formação de ripples. Esta distribuição heterogênea está relacionada com a hidrodinâmica em pequena escala, que permite ou não que sedimentos tão próximos possam ser colonizados (Noffke *et al.*, 2001; Stal, 2010; Cuadadro *et al.*, 2013). O sedimento colonizado pelo tapete apresenta-se elevado em relação aos bolsões de erosão devido à maior estabilidade do sedimento e captura de grãos de sedimentos em suspensão, que se aderem ao material viscoso produzido pela comunidade (Valentine *et al.*, 2014). Nestes tapetes foi possível observar MISS como remanescentes erosionais; pequenos fragmentos flutuando e domos fotossintéticos.

A presença da comunidade de tapetes altera a dinâmica do sedimento. Entre os fatores considerados os maiores preditores de resistência à erosão estão teor de clorofila-*a*, carboidrato e quantidade de água (Yallop *et al.* 2000). Os resultados de clorofila, carboidrato e proteína mostram a influência que a comunidade de tapetes apresenta especialmente nos 5 mm superiores do sedimento. De acordo com Fenchel (2002) a profundidade a qual o tapete atinge no sedimento é determinada pela difusão de gradientes, metabólitos e rápida atenuação da luz através da comunidade. Uma vez formado o tapete, o sedimento colonizado apresenta 5 a 10 vezes maior resistência do que sedimentos não colonizados (Neumeier *et al.*, 2006), especialmente devido a produção destes metabólitos.

A riqueza de espécies para a maioria dos tapetes foi baixa, em média 20 espécies por amostra, o que corrobora com o fato de que comunidades com grande densidade de organismos costumam apresentar grande abundância de uma a três espécies, como também encontrado neste estudo (Colijn & Dijkema, 1981; Underwood, 1994; Thornton

et al., 2002; Forster *et al.*, 2006). Os tapetes associados à vegetação apresentaram maior riqueza média em decorrência da maior estabilidade do sedimento, que leva a formação de comunidades mais complexas, e pela disponibilidade de mais nichos, uma vez que a zona fótica destes tapetes pode ser mais profunda e sua superfície mais heterogenicamente diversa devido ao sombreamento parcial pelas fanerógamas.

A densidade celular dos tapetes coletados não reflete necessariamente a extensão destes, visto que por vezes pequenas manchas apresentaram grandes densidades por estarem protegidas da erosão. Neste estudo a densidade teve maior variação dos resultados nos tapetes mais expostos do que naqueles associados à vegetação, mas sempre acima de 10.000 cél.cm⁻², no qual a comunidade pode ser considerada um tapete microbiano (Underwood *et al.*, 1998). A densidade, riqueza e complexidade de tapetes microbianos estão diretamente relacionadas ao tempo que esta comunidade tem para se estabelecer no sedimento. Quando expostas a hidrodinâmica em sedimentos na região intermareal estas comunidades estão mais suscetíveis à erosão e sua densidade vai depender de quanto tempo este tapete teve para crescer antes de ser coletado. Por outro lado, os tapetes protegidos por vegetação apresentam maior estabilidade e sua densidade tende a flutuar menos.

A comparação da riqueza e abundância relativa de espécies em tapetes em um mesmo dia de amostragem mostra que a comunidade responde aos fatores ambientais associados à região intermareal mediana e superior, tais como erosão, exposição à dessecação, salinidade e temperatura. A ocorrência da vegetação na região intermareal superior oferece maior estabilidade, levando ao aumento da riqueza, enquanto tapetes mais expostos na região intermareal mediana apresentam dominância de poucas espécies.

Por outro lado, de acordo com a diversidade de genes 16S e nifH, a zona onde o tapete é formado influencia na composição de OTUs, mas não necessariamente na riqueza. A diferença na composição de OTUs nos diferentes tipos de tapete têm sido relacionada com as variações ambientais de cada local, tais como disponibilidade de água, salinidade e temperatura (Severin *et al.*, 2010).

5. Conclusão

Os tapetes microbianos da Lagoa dos Patos são principalmente dominados por cianobactérias filamentosas, heterocitadas ou não e diatomáceas penadas. Apenas onze espécies apresentaram eventos de dominância, mas a estabilização do sedimento fornecida por estas poucas espécies permite que outras espécies também colonizem o sedimento, como por exemplo, as algas verdes. A composição do tapete é afetada pela zona intermareal onde ele ocupa. Na zona intermareal superior os tapetes ficam menos expostos a erosão, e freqüentemente associados à fanerógamas, possibilitando a ocorrência de comunidades mais complexas, estáveis e com maior teor de clorofila e proteína. Na zona intermareal mediana a comunidade de tapete fica exposta a forças físicas que aumentam a erosão, evidenciada pela observação de MISS. As comunidades de tapetes microbianos no hemisfério Sul deveriam ser foco de mais estudos, tendo em vista seu papel ecológico e geológico em processos de bioestabilização de sedimentos e fixação de nitrogênio. Uma vez relatada à ocorrência de mais tapetes microbianos na América do Sul, espera-se que estudos focados na importância ecológica destas comunidades comecem também a surgir.

Capítulo 3: Tapetes Microbianos da Lagoa dos Patos (RS – Brasil): Sazonalidade e importância de fatores meteorológicos

Resumo - As comunidades de tapetes frequentemente ocorrem associadas à zona intermareal mediana, onde o sedimento está constantemente exposto a eventos de erosão e deposição, ou superior, mais afetada durante eventos de maré alta ou tempestades. O objetivo deste trabalho é relacionar a ocorrência e composição de tapetes microbianos na Lagoa dos Patos com fatores meteorológicos importantes na hidrodinâmica do estuário. A amostragem dos tapetes microbianos foi feita por busca visual na zona intermareal do Saco do Mendanha, no estuário da Lagoa dos Patos entre Novembro de 2012 e Julho de 2014. Fatores meteorológicos como direção e força do vento, precipitação, umidade relativa do ar e nível da água do estuário foram correlacionados com a ocorrência de tapetes através de uma Análise de Componentes Principais (PCA) após normalização dos resultados utilizando Escore-Z. De acordo com nossos resultados, o nível da água no estuário, principalmente determinado pela direção do vento e pelo aporte de água doce, é um dos principais fatores determinantes da ocorrência e composição de tapetes na Lagoa dos Patos. Durante as estações de outono e inverno, quando o nível da água costuma aumentar e a salinidade fica baixa, os tapetes ocorreram apenas na zona supramareal, enquanto que na primavera e verão, com nível de água mais baixo e frequentemente salobra, os tapetes ocorrem também na zona mesomareal. A presença da água salgada nos meses mais quentes também diminuiu a ocorrência de algas verdes. Nossos resultados sustentam a hipótese de que a ocorrência e distribuição de tapetes microbianos na Lagoa dos Patos está associada a condições que favorecem a maior umidade no sedimento, especialmente para aqueles tapetes que ocorrem na zona intermareal superior, e às condições em que a direção e intensidade do vento não levam a erosão da margem colonizada, para tapetes que ocorrem na zona intermareal mediana.

Palavras-chave: tapetes microbianos; ocorrência; composição; fatores meteorológicos; zona intermareal; estuário

1. Introdução

Tapetes microbianos são densas comunidades bênticas de microrganismos (Stal, 1995). Esta estrutura proporciona um habitat tridimensional onde uma população microbiana metabolicamente diversa coexiste e interage (Paerl & Yannarell, 2010). Em

tapetes microbianos as cianobactérias e diatomáceas, que geralmente estão associadas às camadas mais superiores, são normalmente os organismos chave. Após a colonização do sedimento por estes organismos, torna-se possível o surgimento e coexistência de diversos microrganismos e seus metabolismos (Stal, 1995).

As comunidades de tapetes freqüentemente ocorrem associadas à zona intermareal mediana, onde o sedimento está constantemente exposto a eventos de erosão e deposição, ou superior, mais afetada durante eventos de maré alta ou tempestades. Muitos estudos têm mostrado a importância de comunidades microbianas psâmicas na bioestabilização de sedimentos e registro de eventos de erosão (Noffke and Petterson, 2008; Noffke, 2010; Pan et al. 2013).

A maioria dos artigos tem relacionado erosão de sedimentos colonizados por comunidades microbianas em zonas intertidais com variações de maré, altura de onda, fluxo de energia, transporte de sedimento e freqüência de chuva (Eckman *et al.*, 2008; Lamote *et al.*, 2012; Cuadrado *et al.*, 2013; Fagherazzi *et al.*, 2014; Gladis-Schmacka *et al.*, 2014), mas também mostram relações com outros fatores importantes, tais como dessecação, evaporação, umidade, radiação solar e temperatura do sedimento (Coelho & Serôdio, 2009; Pan *et al.*, 2013)

Estudos de comunidades de tapetes na América do Sul ainda são escassos (Severin & Stal, 2010) muito embora alguns destes trabalhos já venham mostrando as relações destas comunidades com forçantes meteorológicas (Cuadrado *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2013). Para a Lagoa dos Patos (RS – Brasil), a maior laguna estrangulada do mundo (10360 km²), não existem relatos científicos de tapetes microbianos, muito embora estes possam ser observados ao longo de todas as estações.

A Lagoa dos Patos está localizada ao Sul do Brasil e, portanto sob clima temperado. Seu eixo principal está coincidentemente orientado com o regime de vento dominante. Ventos nordeste dominam durante todo ano, mas com marcante ocorrência de vento leste durante o verão e sudoeste durante o inverno. A bacia hidrográfica da Lagoa dos Patos compreende uma área de 200 km², com altas descargas durante o inverno e início da primavera e baixa descarga durante verão outono, embora a variação de descarga de ano para ano possa variar consideravelmente (Tomazelli, 1993).

O vento nordeste domina durante todo ano, verão e primavera são caracterizados também pela presença do vento leste enquanto inverno e outono apresentam ventos sudoeste. A média de vento se encontra entre 3 e 5 m s⁻¹ (Tomazelli, 1993). O aporte de água dos afluentes está associado a precipitação em toda sua bacia hidrográfica, com maior descarga no fim do inverno, muito embora valores de precipitação possam apresentar grandes flutuações de um ano para outro (Möller *et al.*, 2001; Marques & Möller, 2008). A salinidade varia de 0 a 34 (Baumgarten, 1987), principalmente influenciada pelo aporte de afluentes e ação dos ventos que determinam nível de maré e entrada da cunha salina (Möller & Castaing, 1999).

Apesar das variações de fatores químicos, físicos e geológicos do estuário da Lagoa dos Patos permitirem a ocorrência dos tapetes microbianos, estes ainda não foram descritos para a região. Portanto, o objetivo deste trabalho é relacionar a ocorrência e composição de tapetes microbianos na Lagoa dos Patos com fatores meteorológicos importantes na hidrodinâmica do estuário.

2. Material e Métodos

2.1. Amostragem e Análises de campo

A amostragem dos tapetes microbianos foi feita por busca visual na zona intermareal do Saco do Mendanha, no estuário da Lagoa dos Patos (Fig.1) entre

Novembro de 2012 e Julho de 2014. Durante este período a coleta procedeu de duas formas. A primeira foi de novembro de 2011 a dezembro de 2012, com buscas com barco por toda a região entre o ponto A e C. A segunda metodologia de coleta foi entre Novembro de 2012 até Janeiro de 2014, quando os tapetes foram coletados nos pontos A, B e C, selecionados por observações prévias pela acessibilidade e ocorrência de tapetes microbianos.

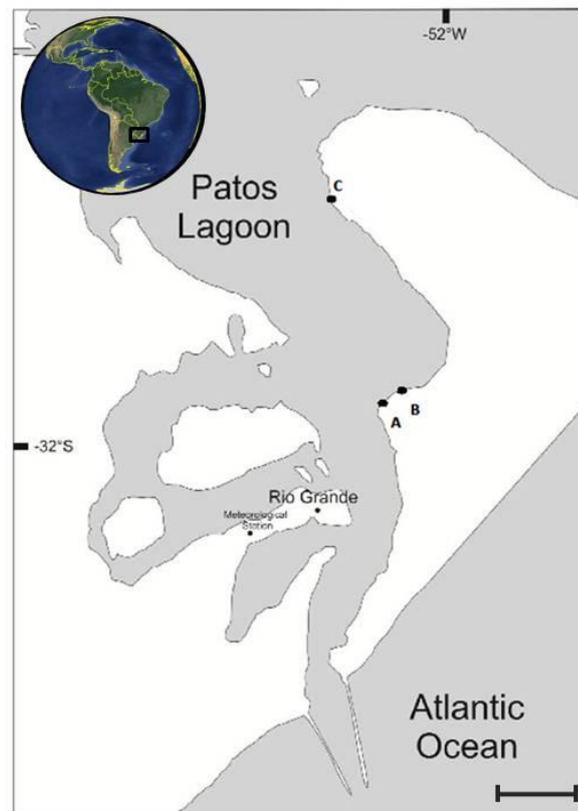


Figura 1. Mapa do Estuário da Lagoa dos Patos (RS-Brasil), com a localização dos pontos de coleta e da estação meteorológica. Escala 5km.

Quando encontrados, os tapetes microbianos foram classificados quanto a região da zona intermareal em que ocorriam (superior, mediana ou inferior) e em duas diferentes categorias, associados à areia ou fanerógamas. Durante este período amostras foram coletadas para análise de composição da comunidade, coletadas usando tubos Falcon® de 50 mL com boca de 2,8 cm de diâmetro.

A área de cobertura dos tapetes foi estimada utilizando fita métrica. Foram também analisadas salinidade, com refratômetro (Meji, Japan), e temperatura da água, com termômetro de mercúrio (Incoterm, Brazil). As amostras foram devidamente processadas e conservadas dependendo da sua finalidade. Para contagem e identificação das algas eucariontes e cianobactérias foram utilizados os primeiros 0,5 cm das amostras, e fixados com 5 mL de Transeau solution (6:3:1 de água destilada, álcool e formalina). Os valores de área amostrada e volume de conservante foram utilizados para converter as contagens em células por centímetro quadrado (cel.cm⁻²).

2.2. Análises de Laboratório

2.2.1. Composição da comunidade de Tapete

As amostras fixadas em solução Transeau foram igualmente agitadas e quantificadas em campos aleatórios em câmara Utermohl 2 mL com aumento de 400x de acordo com Edler e Elbrächter (2010) e o resultado da contagem convertido para cél.cm⁻². Para identificação das diatomáceas foram preparadas lâminas permanentes segundo o método de Simonsen (1974) para observação e contagem de 200 valvas por amostra em 1000x. Foram consideradas dominantes aquelas espécies que apresentaram contagens de indivíduos (filamento, célula ou colônia) acima de 50 % de toda a comunidade.

A identificação dos táxons foi feita baseada em bibliografia especializada (Prescott *et al.*, 1975; Croasdale *et al.*, 1983; Komárek, 1983; Komárek and Fott, 1983; Parra *et al.*, 1983; Round 1990; Komárek and Anagnostidis, 1998; Komárek and Anagnostidis, 2005; Bicudo e Menezes, 2006; Komarek, 2013; Talgatti, 2014).. Todos os táxons estão organizados de acordo com duas classificações. A abordagem Filogenética para algas eucariontes (Van den Hoek *et al.*, 1995) e cianobactérias (Komárek, 2005) foi usada para análises qualitativas e quantitativas. A segunda

classificação aplicada foi a abordagem de Grupos Morfo-Funcionais (MFG) adaptada de Salmaso & Pádisak (2007) descrita em Guimarães *et al.* (2013), e foi utilizada apenas para análises quantitativas. Na abordagem MFG todos os organismos flagelados estão divididos em quatro grupos baseados em seu potencial mixotrófico ou autotrófico e suas características estruturais: i) flagelados mixotróficos coloniais (CMF); ii) flagelados mixotróficos unicelulares (UMF); iii) flagelados autotróficos unicelulares (UAF); e iv) flagelados autotróficos coloniais (CAF). As cianobactérias estão divididas em heterocitadas (HCY), filamentosas não heterocitadas (FCY) e coloniais (CCY), enquanto as diatomáceas foram divididas em cêntricas (CDI) e penadas (PDI). As algas verdes autotróficas estão divididas em três grupos distintos: i) algas verdes cocóides e espécies unicelulares (GCU); algas verdes coloniais ou cenobiais (GCC); e iii) algas verdes filamentosas (GFI).

2.2.2. Dados Meteorológicos

Dados meteorológicos de todo período amostral foram obtidos do Banco de Dados do Núcleo de Física Ambiental da FURG (Rio Grande – RS - Brasil), localizado entre 15 e 20 Km do ponto de amostragem (Fig.1). Fatores meteorológicos como direção e força do vento, precipitação e umidade relativa do ar foram correlacionados com ocorrência de tapetes. Dados de variação do nível da água dentro do estuário foram obtidos junto à Praticagem do Porto de Rio Grande.

2.2.3. Análise Estatística

As correlações entre fatores físico, químicos e biológicos (abundância absoluta) foram feitas através de uma Análise de Componentes Principais (PCA) no software PAST 3x (Hammer *et al.*, 2001) após normalização dos resultados utilizando Escore-Z (Bini, 2007; Mann, 2003).

3. Resultados

Durante o primeiro período de amostragem foram encontrados em todas as coletas tapetes microbianos na zona intermareal superior, sempre associados à fanerógamas. Por outro lado, os tapetes microbianos da zona intermareal mediana, associados ao sedimento, ocorreram de novembro de 2011 à março de 2012 e em novembro de 2012, quando os ventos eram frequentemente mais fortes (média entre 3,43 e 5,10 na escala Beaufort) e de predominância Leste e Nordeste e nível da água abaixo de 33,2 cm. Nas coletas com tapetes microbianos na zona intermareal mediana os ventos foram mais intensos, e de predominância Leste e Noroeste, as temperaturas foram superiores e apresentaram níveis mais baixos de água (Tab. 1).

Tabela 1. Ocorrência de Tapetes Microbianos e dados de vento, temperatura, precipitação, salinidade e nível da água (WL) na Lagoa dos Patos (RS – Brasil) entre Novembro de 2011 e Dezembro de 2012. Linhas em cinza escura evidenciam a ocorrência de tapetes na zona intermareal mediana.

Samples		Intermareal Zone		Wind Beaufort Scale			Temperature			Precipitation			Sal.	WL	
Year	Date	Upper	Middle	Mean	Min	Max	Str. Wind	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max		
2011	17/11	Yes	Yes	4,19	1	9	E	20,29	17,2	24,8	0	0	0	11	33,2
	1/12	Yes	Yes	4,62	0	9	E	23,61	20,4	28,6	1,05	0	11,8	30	20,5
	4/1	Yes	Yes	5,10	2	9	NE	22,84	19,2	25,2	0,74	0	7,6	30	29,6
	19/3	Yes	Yes	3,43	0	6	E	25,18	21,3	34,6	0,04	0	0,4	10	28,7
	26/3	Yes	No	1,90	0	5	SW	23,00	18,6	33	1,94	0	29,4	10	46,9
2012	2/4	Yes	No	2,57	0	5	NE	19,00	14	24,8	0	0	0	34	43,8
	9/4	Yes	No	2,38	1	5	S	22,28	15,4	29,2	0,63	0	12,8	20	41,9
	20/11	Yes	Yes	4,57	2	7	E	21,51	18	26,5	0,43	0	8	7	30,0
	12/12	Yes	No	3,24	0	9	SW	25,84	21,6	31,4	2,26	0	27,8	28	39,3

A PCA dos resultados da Tabela 1 apresentou explicação da distribuição dos resultados de 54,7% para o componente 1 e de 22,7% para o componente 2. O componente 1 apresentou correlação positiva com precipitação, nível da água e meses sem ocorrência de tapetes e correlação negativa com vento e meses com ocorrência de tapetes. O componente 2 apresentou correlação positiva com salinidade, precipitação e temperatura, bem como com meses com ou sem ocorrência de tapetes na zona intermareal mediana, e negativa para três meses de ocorrência dos mesmos tapetes (Fig.2).

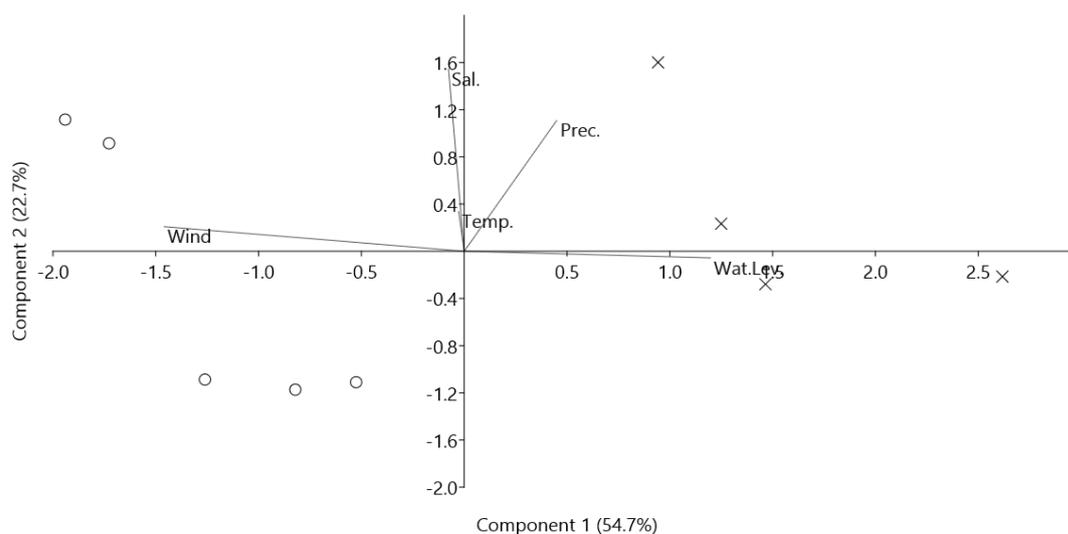


Figura 2. Análise dos Componentes Principais (PCA) da ocorrência de tapetes microbianos na zona intermareal mediana, intensidade do vento, precipitação total, temperatura do ar, salinidade e nível da água no Estuário da Lagoa dos Patos (RS – Brasil) entre Novembro de 2011 e Dezembro de 2012. Ocorrência de tapetes (○); tapetes não detectados (x).

Os tapetes microbianos ocorreram durante grande parte do segundo período de amostragem, com densidades variando principalmente entre 5×10^4 e 2×10^5 ind. cm^{-2} , mas com um evento com densidade de mais de 4×10^5 ind. cm^{-2} (Fig. 3-A). Durante os

meses quentes (dezembro a março), quando houve ocorrência de tapetes na zona intermareal mediana, estes apresentaram maior dominância percentual de cianobactérias filamentosas e diatomáceas penadas (Fig. 3-A). Com a queda de temperatura entre os meses de abril e outubro aumenta o percentual de ocorrência de algas verdes cocóides, filamentosas e unicelulares (Fig. 3-A). Durante os meses com ocorrência de tapetes na zona inframareal o nível de água ficou abaixo de 33,2 cm.

Entre os fatores meteorológicos a intensidade dos ventos (Fig. 3-B) e temperatura (Fig. 3-C) apresentaram um perfil similar, com valores menores entre o final do outono e início da primavera, mas contrário ao de umidade relativa do ar (Fig. 3-E). A precipitação apresentou grande variação, mas os maiores valores foram entre novembro e abril (fim da primavera e início do outono) (Fig.3-D).

A PCA do primeiro período de amostragem (novembro de 2011 até dezembro de 2012) apresentou explicação da distribuição dos resultados de 27,53% para o componente 1 e de 19,23% para o componente 2 (Fig. 4). O componente 1 apresentou correlação negativa com vento, temperatura, tapetes que ocorreram durante o verão e com os meses onde não houve ocorrência de tapetes, e correlação positiva com umidade relativa do ar, a maioria dos grupos morfo-funcionais e tapetes microbianos de ocorrência nos meses frios (Fig.4). O componente 2 apresentou correlação positiva com tapetes que ocorreram durante os meses quentes, e com os principais grupos que ocorreram nestes meses, como cianobactérias filamentosas e coloniais, diatomáceas (Fig.4). Também apresentaram correlação positiva com o componente 2 os meses de abril e maio, que apresentaram duas das maiores densidades, e as algas verdes cenocíticas e coloniais, que apresentaram grande percentual durante estes dois meses (Fig. 3-A e Fig. 4). Correlacionaram-se negativamente com o componente 2 a umidade

relativa do ar, os tapetes que ocorreram entre junho e setembro e algas verdes cocóides unicelulares e filamentosas (Fig. 4).

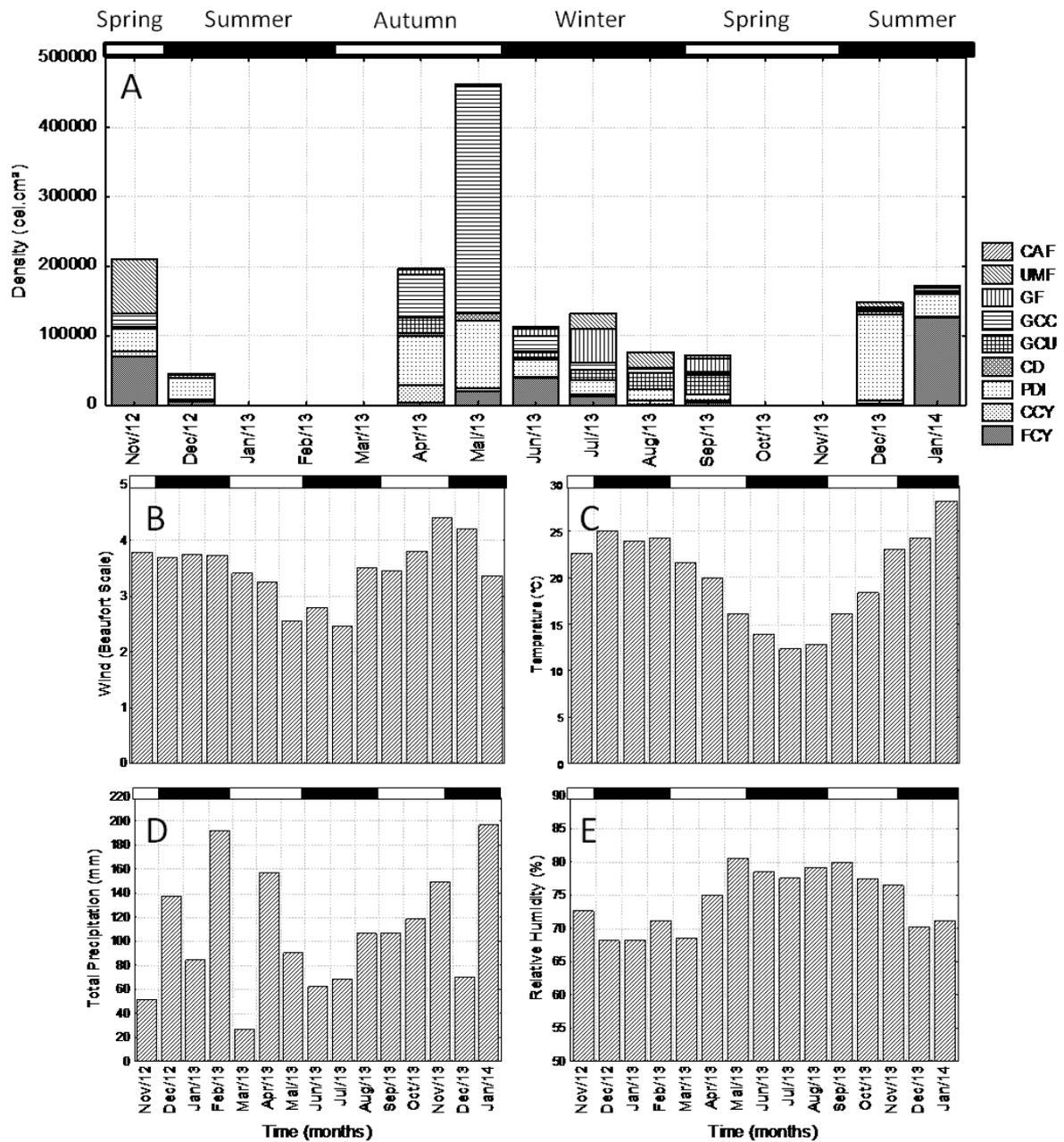


Figura 3. Ocorrência de Tapetes e composição de acordo com Grupos Morfofuncionais (A), intensidade do vento (B), temperatura do ar (C), precipitação total (D) e umidade relativa do ar (E) da Lagoa dos Patos (RS – Brasil) entre Novembro de 2012 e janeiro de 2014. Flagelados mixotróficos unicelulares (UMF); flagelados autotróficos coloniais (CAF); cianobactérias filamentosas (FCY) e coloniais (CCY); diatomáceas cêntricas (CDI) e penadas (PDI); algas verdes cocóides e unicelulares (GCU); algas verdes coloniais ou cenobiais (GCC); e algas verdes filamentosas (GFI).

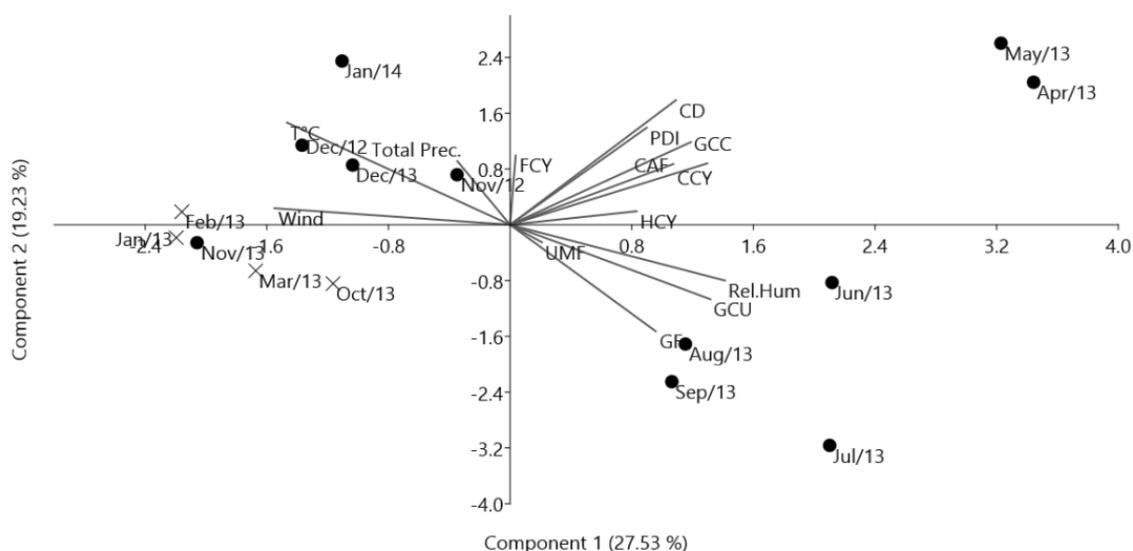


Figura 4. Análise de Componentes Principais (PCA) da ocorrência de tapetes, composição de acordo com Grupos Morfofuncionais, intensidade do vento, temperatura, precipitação total e umidade relativa do ar da Lagoa dos Patos (RS – Brasil) entre Novembro de 2012 e janeiro de 2014. Ocorrência de tapetes (●); tapetes não observados (x); flagelados mixotróficos unicelulares (UMF); flagelados autotróficos coloniais (CAF); cianobactérias filamentosas (FCY), heterocitadas (HCY) e coloniais (CCY); diatomáceas cêntricas (CDI) e penadas (PDI); algas verdes cocóides e unicelulares (GCU); algas verdes coloniais ou cenobiais (GCC); e algas verdes filamentosas (GFI).

Durante o período de coleta foram também observados eventos isolados de erosão e soterramento de tapetes microbianos. No evento de erosão, um tapete foi observado antes e depois de uma tempestade. Este cobria, antes da tempestade, cerca de 3.400 m² na zona intermareal, e após a tempestade apenas 290 m², cerca de 8,5% da cobertura inicial. No evento de deposição, após uma tempestade onde a hidrodinâmica da Lagoa gerou deposição de sedimento, este ficou soterrado por cerca de 0,5 cm de sedimento.

4. Discussão

Embora poucos trabalhos tenham descrito comunidades de tapetes microbianos na América do Sul, e, até o momento, nenhum trabalho tenha sido publicado para a Lagoa dos Patos, nossos resultados sustentam que a ocorrência destas comunidades é freqüente

e tem sua importância para a produtividade local. A zona intermareal de praias arenosas da região estuarina é, ao longo de quase todo ano, coberta por comunidades de tapete, que eventualmente atingem grandes extensões. Estas comunidades são importantes como produtores primários, no ciclo do nitrogênio, estabilidade do sedimento e etc. (Stal, 2010; Severin & Stal, 2010), mas por se encontrarem na zona intermareal, são sensíveis a eventos meteorológicos que levem a erosão, soterramento e dessecação (Noffke *et al.*, 2002; Eckman *et al.*, 2008; Coelho *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2013). Desta forma a ocorrência dos tapetes na zona intermareal apresentou correlação com nível da água, precipitação, vento e umidade relativa do ar, fatores relacionados com erosão e dessecação, dois dos principais elementos de estresse da zona intermareal.

Na Lagoa dos Patos foram observados tapetes microbianos que ocorriam na zona intermareal superior, associado à fanerógamas costeiras (*Cyperus cf. minus*, *Cyperus cf. obtusatus*, *Bacopa monnieri*, *Hydrocotilis boraniensis* e *Juncus sp.*), onde ficava mais protegido da erosão, e na zona intermareal mediana, onde estava mais exposto a hidrodinâmica da lagoa e sua ocorrência ficou restrita a condições meteorológicas favoráveis. Tapetes da zona intermareal superior são mais influenciados por fatores climáticos, enquanto os tapetes da zona intermareal inferior ficam mais expostos às variações de maré (Brotas *et al.*, 1995).

Embora os tapetes não tenham sido observados em algumas saídas de campo, eles ocorreram em todas as estações do ano. No entanto, quando feita a correlação entre tapetes microbianos da zona intermareal média e fatores meteorológicos, foi possível perceber que estes ocorrem em períodos do ano com ventos mais intensos. Embora este resultado pareça contraditório, pois os tapetes da zona intermareal média ficam mais expostos a erosão gerada pelo vento (Eckman *et al.*, 2008), ele é explicado pela dinâmica da lagoa dos Patos. Os ventos mais intensos neste período foram de

predominância Leste e Nordeste, o que é característico da região. Estes ventos favoreceram a ocorrência de tapetes na margem leste da Lagoa dos Patos por dois motivos: (1) estes tapetes ficam abrigados da ação do vento por uma estreita faixa que separa o estuário do oceano, como consequência a formação de ondas gera maior erosão na margem oeste do estuário, e não na margem leste colonizada; e (2) ventos de leste e nordeste estiveram associados com maré baixa, o que aumenta a zona de praia e diminui o efeito da intensidade dos eventos de erosão. A maior ocorrência de cianobactérias filamentosas e diatomáceas penadas durante o mesmo período na zona intermareal média está provavelmente relacionada ao fato de que estes grupos são mais eficientes na colonização e bioestabilização de sedimentos pela formação de redes de filamentos e liberação de exopolissacarídeos que formam aglomerados mais estáveis.

Por outro lado, períodos de maré alta, limitaram a ocorrência dos tapetes à zona intermareal superior, onde as fanerógamas ajudam na estabilização do sedimento. Nestes eventos a predominância de diatomáceas e cianobactérias foi reduzida, e um maior percentual de algas verdes cenocíticas, cocóides, coloniais e filamentosas foi observado. Estes tapetes ocorreram em todos os períodos do ano, mas especialmente durante o inverno, quando a água do estuário está predominantemente doce, o que pode ter levado a mudança da composição da comunidade, com maior frequência de algas verdes. Além disso, estas comunidades estão sob maior influência de chuva e água doce de afloramento por terem ocorrido ao longo de todo ano, inclusive nos meses mais chuvosos. Alguns trabalhos relatam que tapetes microbianos podem ser importantes na sucessão ecológica em zonas intertidais ou dunas, iniciando a estabilização do sedimento, permitindo inicialmente a formação de uma comunidade microbiana mais complexa e posteriormente permitindo a germinação de plantas vasculares (Grootjans *et al.*, 1997).

A hidrodinâmica é um importante fator para ocorrência de tapetes microbianos especialmente na zona intermareal. Experimentos com tapetes microbianos crescendo em tanques de onda mostram que tapetes microbianos se desenvolvem onde o movimento de sedimento é negligenciado (Mariotti *et al.*, 2014). Ondas e marés afetam a distribuição do sedimento, inviabilizando sua ocorrência de tapetes ou apenas alterando a composição da comunidade (Eckman *et al.*, 2008; Fagherazzi *et al.*, 2014). No estuário de Baía Blanca (Argentina), alguns trabalhos foram feitos em tapetes microbianos que ocorrem protegidos por fragmentos de vegetação de ervas marinhas (Cuadrado *et al.*, 2014), de forma muito parecida com o que ocorre no estuário da Lagoa dos Patos. Embora a formação de um tapete microbiano possa ser relativamente rápida, ela ocorrerá apenas onde a hidrodinâmica em pequena escala permitir (Stal, 2010).

Diversos trabalhos relatam o estresse gerado pela dessecação em ambientes intertidais, especialmente quando associada a variações de maré, exposição à radiação solar e vento. Em nosso trabalho correlacionamos a umidade relativa do ar com a ocorrência de tapetes. A umidade relativa do ar foi maior durante os meses mais frios, quando os tapetes ocorreram associados à zona intermareal superior, associado à vegetação, onde ficam também mais abrigados do vento e radiação solar. Tapetes se correlacionam negativamente com condições que favorecem a evaporação de água do sedimento, como alta temperatura e radiação solar (Pan *et al.*, 2013). A dessecação leva a redução da atividade fotossintética, refletindo na produtividade primária da biomassa (Coelho *et al.*, 2009).

Por fim a composição dos tapetes microbianos apresentou correlação com os fatores meteorológicos. A ocorrência de cianobactérias e diatomáceas estiveram relacionadas positivamente com alta temperatura e precipitação, características mais comuns no verão. Estes tapetes ocorreram especialmente na zona intermareal mediana.

Por outro lado, algas verdes foram mais freqüentes na zona intermareal superior quando a umidade relativa do ar esteve alta, especialmente nos meses mais frios do ano. Cianobactérias e diatomáceas são freqüentemente relacionadas com temperatura altas em estuários (Underwood, 1994; Thornton *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2013), quando sua ocorrência fique limitada também à disponibilidade de água, pois a influência da dessecação tende a aumentar com a temperatura (Pan *et al.*, 2013).

Neste trabalho analisamos especialmente a influência de fatores meteorológicos na ocorrência e composição de tapetes microbianos. Existem, além destes, diversos fatores químicos, tais como variação sazonal da concentração de nutrientes e salinidade, que também influenciam na ocorrência de comunidades de tapetes (Pinckney *et al.*, 1995^a; Pinckney *et al.*, 1995^b; Underwood *et al.*, 1998). A salinidade, embora considerada neste trabalho, é de difícil correlação, pois em um estuário como a Lagoa dos Patos é difícil definir o tempo ao qual a comunidade amostrada ficou exposta a salinidade, e provavelmente por isso as correlações das comunidades com salinidade não foram muito fortes.

Quando ocorre uma tempestade após a formação dos tapetes microbianos a comunidade pode ser erodida ou soterrada. Na Lagoa dos Patos a erosão pôde ser observada por registros de padrões erosivos na superfície do tapete, e a formação de diversos fragmentos que se soltam do tapete (Noffke *et al.*, 2001; Cuadrado & Pizani, 2007). Por outro lado, o soterramento pode ser suficiente para inibir a fotossíntese da comunidade (Noffke *et al.*, 2002). No entanto, muitas cianobactérias filamentosas e diatomáceas penadas são capazes de deslizar verticalmente, voltando a cobrir a superfície do sedimento após algumas horas, contanto que as condições hidrodinâmicas permitam.

5. Conclusão

Nossos resultados sustentam a hipótese de que a ocorrência de tapetes microbianos na Lagoa dos Patos está associada a condições que favorecem a maior umidade no sedimento, especialmente para aqueles tapetes que ocorrem na zona intermareal superior, e a condições em que a direção e intensidade do vento não levam a erosão da margem colonizada, para tapetes que ocorrem na zona intermareal mediana. Estas condições influenciam também na composição dos tapetes microbianos, mais colonizados por cianobactérias filamentosas e diatomáceas penadas na região inframareal. Os resultados mostram a importância das variáveis físicas ambientais, especialmente de força e intensidade de vento, para a ocorrência de tapetes microbianos, tal como a importância destes na bioestabilização do sedimento.

Capítulo 4: Efeito da Aclimação e Estresse Salino em *Anabaena* sp. isolada de um Tapete Microbiano Estuarino

Resumo - Poucos estudos têm focado em espécies de microalgas ou cianobactérias isoladas de tapetes microbianos no hemisfério Sul. O objetivo principal deste artigo é estudar o estresse e aclimação de *Anabaena* sp. à diferentes salinidades, uma cepa de cianobactéria heterocitada isolada de tapetes microbianos de uma região estuarina. O experimento foi planejado em três diferentes tratamentos em triplicata que simulassem condições naturais de água doce, salgada e a mistura destas. Para isto foram utilizados os meios BG11° (salinidade $\cong 0$) BSN° ($\cong 15$) e ASN3° ($\cong 30$). As culturas foram amostradas a cada 48h por 38 dias, as taxas de crescimento foram calculadas por meio de contagens celulares (células vegetativas, heterocitos e acinetos) análises de teor de clorofila-*a*, enquanto que a fixação de nitrogênio foi estimada pelo método da Redução do Acetileno (ARA). Os resultados mostram que os tratamentos com diferentes salinidades não afetaram as taxas de crescimento de *Anabaena* sp., que apresentou um lento crescimento para todos os tratamentos. No entanto, reduziram as contagens de acinetos e heterocitos nos tratamentos com salinidade. Por outro lado, apesar do menor número de heterocitos, os resultados de ARA se apresentaram inicialmente maiores em alta salinidade e posteriormente inalterados. Os resultados de contagem de acinetos mostram que a cepa está mais adaptada ao meio com alta salinidade, enquanto que as contagens de heterocitos indicam que estes são mais eficientes na fixação de nitrogênio em alta salinidade, pois foram capazes de atingir a mesma taxa de fixação de nitrogênio no diferentes tratamentos, apesar da diferença nas contagens de heterocitos.

Palavras-chave: Fixação de Nitrogênio; Cianobactéria; Salinidade; Taxas de Crescimento

1. Introdução

A salinidade é um dos principais fatores ambientais determinantes da composição de comunidades de microorganismos em ambientes estuarinos e costeiros (Fernandes *et al.*, 1993; Severin *et al.*, 2001; Bolhuis *et al.*, 2013). Comunidades de tapetes costumam ocorrer em zonas intertidais onde freqüentemente são expostas a dessecação e hipersalinidade (Abed *et al.*, 2008). Organismos que vivem neste tipo de ambiente

necessitam ter uma grande adaptabilidade ao estresse gerado pela salinidade, especialmente produzindo osmólitos intracelulares em ambientes hipertônicos e liberando água ativamente em ambientes hipotônicos (Franks e Stolz, 2009).

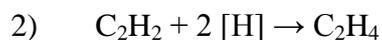
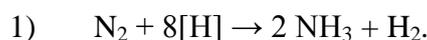
A salinidade, por estresse osmótico ou iônico (Fernandes *et al.*, 1993), afeta o metabolismo de cianobactérias, alterando taxas de crescimento, formação e germinação de acinetos, taxas fotossintéticas e fixação de nitrogênio (Blackburn *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1993; Baker & Bellifemine, 2000; Moisander *et al.*, 2002; Faithfull & Burns, 2006). As respostas ao estresse salino variam com a espécie exposta e o ambiente de onde foi isolada (Fernandes *et al.*, 1993; Moisander *et al.*, 2002). Entre os gêneros que tem apresentado grande flexibilidade ao gradiente de salinidade e que têm sido alvo de estudos está *Anabaena* (Rhe & Lederman, 1983; Layzel *et al.*, 1985; Turpin *et al.*, 1985; Lee & Rhee, 1997; Shafik *et al.*, 2003).

O gênero *Anabaena* caracteriza-se por espécies filamentosas (tricomas) livre flutuantes, planctônicos, solitárias, frouxamente ou estritamente associadas, com células cilíndricas, constrictas ou quase incosntrictas à parede celular, células terminais não estreitadas ou muito pouco estreitadas, às vezes sem bainha ou com indistinto envelope mucilaginoso sem cor. Células sempre distintamente mais longas do que largas, frequentemente cilíndricas, menos frequentemente elipsoidal alongada, obrigatoriamente ou facultativamente com aerótopos, raramente sem aerótopos; células terminais frequentemente de mesmo tamanho e forma das outras células vegetativas e envolta pelo ápice, ou menos frequentemente levemente atenuadas (cônicas) e excepcionalmente hialinas. Heterocitos solitários (raramente em pares), intercalares, mais ou menos esféricos, amplamente elipsoidal ou cilíndrico. Acinetos solitários, usualmente distintos dos heterocitos. Reprodução por fragmentação de tricomas e acinetos (Komárek, 2013).

Métodos para medir Fixação de Nitrogênio

Apesar de haverem diversos métodos para medir fixação de nitrogênio, nesta tese utilizamos o método da Redução do Acetileno (Acetylene Reduction Assay - ARA). Este método é baseado na inespecificidade da enzima nitrogenase. Da mesma forma com que ela reduz N_2 em duas moléculas de NH_3 , ela também reduz Acetileno (C_2H_2) em Etileno (C_2H_4). O que determinará a molécula a ser reduzida pela enzima é a disponibilidade, de forma que acima de 20% de Acetileno é garantida a saturação da enzima pelo mesmo, de forma que ocorrerá apenas redução de acetileno (Stal 1988). Esta metodologia é geralmente aplicada em culturas ou amostras em frascos com tampa de borracha onde o C_2H_2 é injetado e após um intervalo de tempo o gás no interior do frasco é analisado por cromatografia gasosa (GC) para análise de C_2H_2 e C_2H_4 .

A desvantagem deste método é que ele não analisa diretamente o N_2 fixado, mas sim o C_2H_2 reduzido, que possui um comportamento parecido com o N_2 . No entanto, com base na quantidade de C_2H_2 reduzido para C_2H_4 podemos inferir quanto de N_2 seria fixado. O Fator de Conversão Teórica é 4, baseado no fato de que o número de moléculas necessárias para reduzir N_2 é 4 vezes maior do que a necessária para converter C_2H_2 (equações 1 e 2)



Alguns autores discutem ainda que este fator deveria ser 3, uma vez que o H_2 produzido com NH_3 pode ser reaproveitado na fixação de N_2 , no entanto isso não diminui a necessidade de 4 vezes mais Hidrogênio para fixar N_2 (Jensen e Cox 1983b; Houchins 1984; Stal 1988; Staal 2003).

Outros métodos incluem método de análise em tempo real de Redução do Acetileno, que mede quase em tempo real a redução de Acetileno, e o $^{15}N_2$. No

entanto, o $^{15}\text{N}_2$ analisa o quanto de N_2 fixado foi incorporado à biomassa do microorganismo, enquanto o ARA analisa a atividade da enzima nitrogenase. Tratam-se, portanto de dois resultados diferentes, pois entre a fixação e a incorporação à biomassa pode haver perdas (Stal 1988).

Objetivo

O objetivo principal deste artigo é estudar o estresse e aclimação a diferentes salinidades de *Anabaena* sp., uma cepa de cianobactéria heterocitada isolada de um tapete microbiano da região estuarina da Lagoa dos Patos (RS-Brasil). Entre os objetivos específicos estão analisar os efeitos da salinidade na taxa de crescimento, diferenciação de células vegetativas em heterocitos e acinetos e fixação de nitrogênio.

2. Material e Métodos

2.1. Microorganismo Experimental

A cepa utilizada foi isolada de tapetes microbianos da Lagoa dos Patos (RS – Brasil) em 2012 (Guimarães et al., dados não publicados), onde ocorrem frequentemente associadas ao sedimento na zona intermareal. A cepa foi identificada com *Anabaena* sp., uma cianobactéria filamentosa heterocitada. Para identificação foram feitas análises em microscopia óptica com bibliografia especializada e análise molecular pelo seqüenciamento de seqüência 16S e nifH obtidos a partir de uma biblioteca genômica da cepa. A partir do seqüenciamento do DNA ribossomal 16S foi construída uma árvore filogenética (Fig. 1) comparando com a seqüência de outras cianobactérias. Para a reconstrução filogenética foi utilizado o método estatístico de agrupamento de vizinhos, incluindo seqüências da cepa de interesse, de outras 25 cianobactérias e uma bactéria (*outgroup*). *Gloeobacter* foi utilizada como espécie basal entre as cianobactérias e *Escherichia coli* como *outgroup* (Hall, 2011; Schirromeister et

al., 2011). Tanto o método taxonômico quanto o molecular levaram ao gênero *Anabaena*, no entanto não foi possível identificá-lo em nível de espécie (Fig. 1).

Após o isolamento da cepa (RS0112), esta foi mantida em meio de cultura BG11 (Rippka *et al.*, 1979) no Banco de Cultivo de Cianobactérias do Laboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas (LCF) Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Antes do início do experimento a cepa passou por um período de aclimação de três meses em meio de cultura BG11° (BG11 modificado pela remoção da fonte de nitrogênio) para estimular a atividade da enzima nitrogenase.

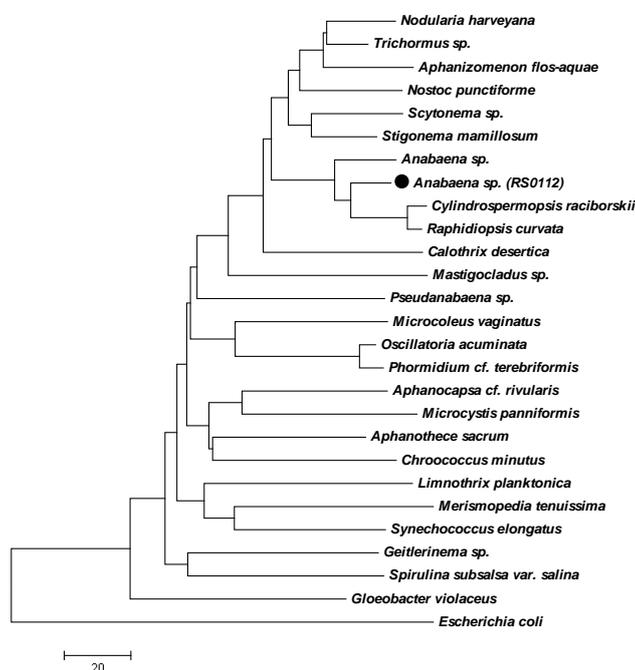


Figura 1. Árvore Filogenética de 26 espécies de cianobactérias. Árvore de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-joining Tree*) baseado em seqüências do DNA ribossômico 16S evidenciando a origem evolutiva de *Anabaena sp.* (●). *Gloeobacter violaceus* foi considerada uma cianobactéria basal e *E. coli* foi utilizada como grupo externo (*outgroup*).

2.2.Experimento 1

Uma cultura da cepa aclimatada ao meio BG11° e em fase estacionária de crescimento foi submetida a dois tratamentos. No primeiro diferentes volumes da cultura (0,5; 1; 2; 4 e 6 mL) foram filtrados em filtro de fibra de vidro Whatman GF/F e os filtros colocados em frascos Chrompack® 10 mL com 0,5 mL de meio BG11° para

análise da Redução do Acetileno. No segundo grupo, por centrifugação, as mesmas concentrações de biomassa foram obtidas, mas ao serem adicionadas aos frascos Chrompack 10 mL, estas foram diluídas em 2 mL de meio de cultura BG11°, sem passar pelo processo de filtração.

Após a análise de Redução de Acetileno, as amostras do tratamento 2 foram filtradas para juntamente com os filtros do tratamento 1 serem analisadas quanto ao teor de clorofila-*a*.

2.3.Experimento 2

O experimento foi planejado em três diferentes tratamentos em triplicata que simulassem condições naturais de água doce, salobra e salgada. Para isto foram utilizados os meios BG11° (Rippka *et al.*, 1979) e ASN3° (Rippka, 1988). O BG11° é um meio cultura para cianobactérias de água doce, no qual os nutrientes, exceto a fonte de nitrogênio, são diluídos em água destilada. No ASN3°, meio de cultura para cianobactérias modificado pela remoção das fontes de nitrogênio, os nutrientes são diluídos em água do mar filtrada e esterilizada. No primeiro tratamento a cepa foi mantida em meio BG11°, com salinidade 0,8 (que por convenção chamaremos de zero); no segundo tratamento a cepa foi mantida em uma mistura de partes iguais de BG11° e ASN3°, obtendo salinidade 14,3 (que convencionalmente chamaremos BSN° ou salinidade 15); e no terceiro grupo apenas em meio ASN3°, com salinidade 28,8 (que chamaremos de salinidade 30). Para os três tratamentos o inóculo da cepa (5% v/v) foi feito a partir de uma cepa aclimatada ao meio BG11°. Os meios de cultura foram mantidos em uma incubadora DBO (Jumo dTrom 304) com temperatura de 25 °C, irradiância de 25 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 16 horas claro e 8 horas escuro.

A cada 48 horas foram coletadas amostras de 6 mL de cada réplica dos três tratamentos. Cada amostra de 6 mL foi dividida em 3 sub-amostras de 2 mL utilizadas

para diferentes análises. A primeira foi fixada com lugol e mantida em tubo Eppendorf® de 2 mL no escuro para contagem por microscopia óptica em câmara de Sedgewick-Rafter. As outras duas frações foram filtradas, utilizando um filtro de fibra de vidro Whatman® GF/F para cada uma. Os dois filtros foram imediatamente submetidos à análise de Redução do Acetileno (ARA). Após análise de redução de acetileno os filtros foram imediatamente utilizados para análise de clorofila-*a*.

Para ARA os filtros foram acomodados em frascos Chrompack 10 mL e a eles adicionados 0,5 mL de meio de cultura estéril. Este volume de meio de cultura evitou a dessecação dos filtros durante o tempo de incubação e expôs os mesmos a diferentes condições de salinidade. Para cada tratamento os filtros foram expostos a duas diferentes condições. Na primeira adicionando 0,5 mL do mesmo meio de cultura na qual foi incubada no início do experimento, e na segunda a um meio de cultura de salinidade maior ou menor, para observar o efeito imediato do estresse salino na atividade da nitrogenase (Fig. 2). Desta forma, para o meio de salinidade zero, um dos filtros foi exposto ao BG11° (condição a qual a cepa já estava aclimatada) e o segundo ao BSN° (caracterizando um estresse salino da menor para a maior salinidade). Para o segundo tratamento, de salinidade 15, o primeiro filtro foi exposto ao meio BSN° (condição de aclimação) e o segundo ao meio BG11° (condição de estresse salino de maior para menor salinidade). No terceiro tratamento, de salinidade 30, o primeiro filtro foi exposto ao meio ASN3° (condição de aclimação) e ao meio BG11° (condição de estresse salino da maior para a menor salinidade). Desta forma foi possível observar o comportamento da cepa a uma condição a qual ela já esta adaptada (BG11°), bem como sua adaptação aos meios com salinidade e o efeito do estresse salino ocorrido no momento da incubação (Fig. 2).

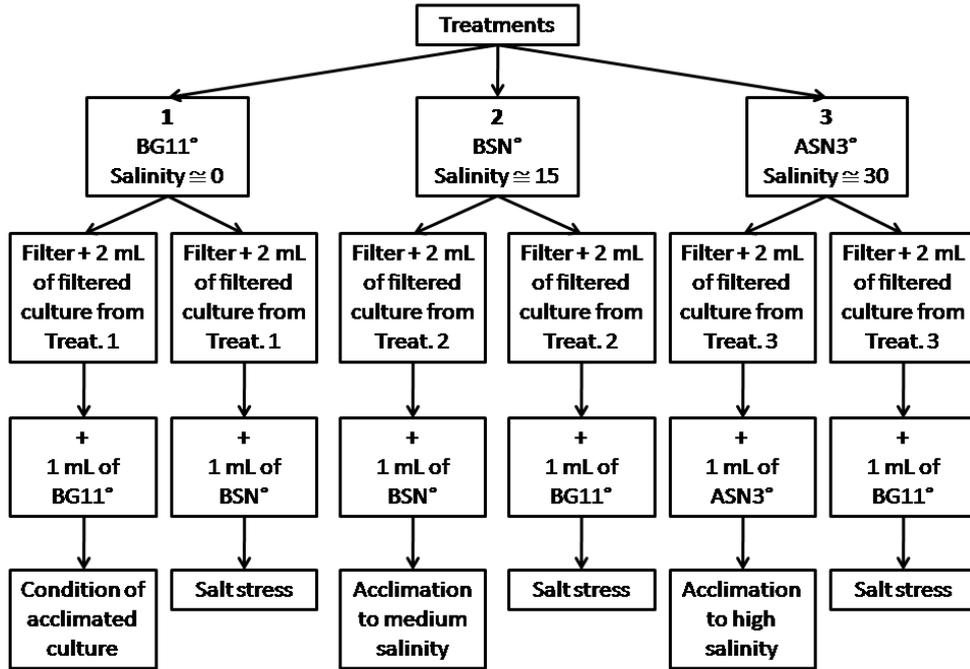


Figura 2. Desenho Experimental do ensaio de Redução de Acetileno (ARA) usando filtros de fibra de vidro Whatman GF/F do Experimento 2.

2.4. Análises

2.4.1. Contagem Celular

As contagens foram realizadas com câmara Sedgwick-Rafter em Microscópio Invertido Axio Vert A1 (ZEISS, Alemanha) com aumento de 400x. Foram contadas células vegetativas, heterocitos e acinetos. Para células vegetativas e acinetos os valores de contagem foram convertidos para cél.mL^{-1} . Para heterocitos os valores foram transformados em heterocitos por célula vegetativa (het.cél^{-1}).

Para o cálculo do tempo de duplicação da biomassa (Guillard, 1973) baseado nas contagens celulares foram considerados os intervalos de tempo de cada tratamento onde era possível observar crescimento, ainda que pequeno. A partir da equação da reta foi analisada a inclinação de cada curva de crescimento.

2.4.2. Análise da Redução do Acetileno (ARA)

Os frascos com filtro dos tratamentos e 0,5 mL de meio de cultura foram fechados com tampa de borracha e com uma seringa foram injetados 1,5 mL de Acetileno. Imediatamente após a injeção os frascos foram incubados em DBO nas mesmas condições dos tratamentos por 60 min. Após a incubação, com auxílio de uma seringa os gases dentro dos frascos foram homogeneizados e uma amostra de 1 mL dos mesmos foi coletada com a mesma seringa. As concentrações de Acetileno (C_2H_2) dentro dos frascos foram calculadas para que mesmo após três horas de incubação o percentual de Acetileno dentro do frasco mantivesse a enzima nitrogenase saturada (Stal, 1988).

As amostras de gás foram analisadas em um Cromatógrafo Gasoso (Global Analyser Solutions) equipado com detector de chama ionizante (FID) de acordo com Stal (1988). Para cada bateria de amostras foram também analisados padrões de Acetileno e Etileno (C_2H_4). O resultado é obtido em área dos picos de Acetileno e Etileno nas amostras, e o cálculo para obter os resultados em nmol de C_2H_4 foi feito de acordo com Stal (1988) considerando a área dos picos, volume de Acetileno injetado e contaminação de Etileno no Acetileno injetado. Por fim os resultados foram padronizados utilizando o teor de clorofila-*a* nos filtros incubados ($nmol C_2H_4 mg chl-a^{-1} h^{-1}$).

Os resultados de acetileno reduzido para etileno pela enzima nitrogenase podem ser convertidos para moléculas de Nitrogênio Atmosférico (N_2) convertido para Amônio (NH_3) dividindo o resultado por quatro de acordo com a reação estequiométrica (Staal *et al.*, 2001), que pode ainda ser multiplicado por dois para obter o resultado de moléculas de nitrogênio (N) fixadas. No presente trabalho esta conversão foi feita para comparar com os resultados de Nitrogênio total da biomassa seca da cultura.

2.4.3. Teor de Clorofila-*a*

Os filtros foram mantidos nos frascos Chrompack para análise de teor de clorofila-*a*, mas o meio de cultura foi transferido para tubos Eppendorf® e centrifugados a 10.000 rpm para precipitação de toda biomassa que possa ter entrado em suspensão durante a incubação. O sobrenadante foi descartado e o precipitado devolvido ao frasco Chrompack. Ao frasco foram adicionados 6 mL de Etanol 96% para extração por 24 h a 4 °C no escuro. Após extração o volume foi novamente centrifugado para análise a 665 nm em espectrofotômetro de acordo com Ritchie (2006). Os resultados foram obtidos em µg de clorofila-*a* (µg Chl-*a*) por filtro para o experimento 1, e em µg de clorofila-*a* por mL (µg Chl-*a* mL⁻¹) para o experimento 2.

O tempo de duplicação da biomassa (Guillard, 1973) a partir da clorofila-*a* foi calculado em intervalos de quatro dias, pois os resultados foram mais consistentes do que para cada dois dias. Uma cultura apresenta crescimento exponencial quando o valor de T₂ é menor ou igual ao intervalo utilizado para o cálculo, no caso 4 dias.

2.4.4. Análise de Carbono e Nitrogênio Total

Para análise de carbono e nitrogênio total da biomassa seca, filtros de fibra de vidro Whatman GF/F foram secos a 60 °C por 24 h e pesados. Amostras de 2 mL de cada tratamento foram filtrados no 30° dia de experimento. Após a filtração os filtros foram novamente secos a 60 °C por 24 h e pesados. O peso de biomassa seca foi calculado pela subtração do filtro seco antes e depois da filtração. Os filtros foram posteriormente secos a frio antes de serem esfarelados para análise de carbono e nitrogênio total em um Analisador Orgânico Elementar Interscience Flash 2000 (Nieuwenhuize et al., 1994).

A partir dos resultados de Nitrogênio total (nM) por µg de clorofila-*a* foi possível inferir o Nitrogênio total para cada dia de amostragem. Do nitrogênio total de cada

amostra foi subtraído o montante da amostra anterior, e o resultado foi dividido por 48 (intervalo em horas entre cada amostra) para obter-se o Nitrogênio total incrementado à biomassa (μg de Chl-*a*) por hora. Este resultado será usado para conferir se os resultados de atividade enzimática da nitrogenase estão corretos.

3. Resultados

3.1. Experimento 1

Tanto no tratamento com filtro ($R^2 = 0,937$, $p < 0,001$) quanto no sem filtro ($R^2 = 0,930$, $p < 0,001$) a redução de acetileno apresentou forte correlação com o teor de clorofila (Fig.3 e 4). Por outro lado, os valores de ARA por teor de clorofila-*a* foram maiores em baixos teores de clorofila-*a* (Fig.3 e 4). Apesar os teores de clorofila-*a* obtidos no tratamento com filtro terem sido inferiores ao do tratamento sem filtro, os valores de ARA para o primeiro tratamento foram um pouco maiores (Fig.3 e 4).

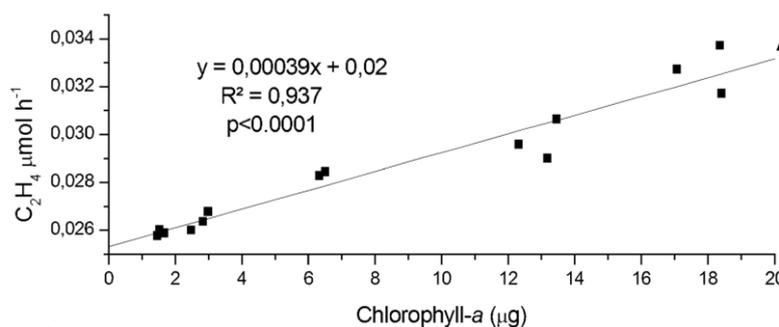


Figura 3. Experimento 1 com filtro: etileno reduzido em diferentes concentrações de clorofila-*a* de *Anabaena* sp..

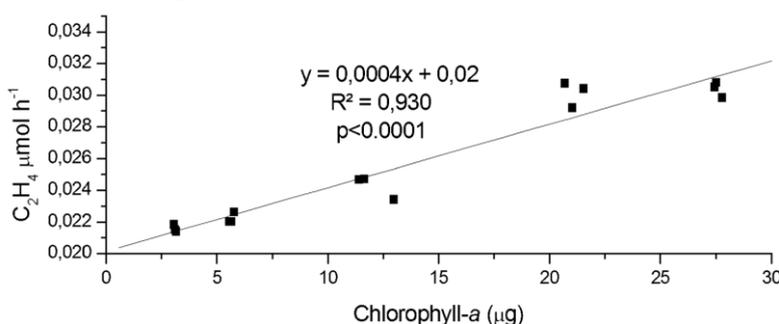


Figura 4. Experimento 1 sem filtro: etileno reduzido em diferentes concentrações de clorofila-*a* de *Anabaena* sp..

3.2.Experimento 2

As curvas de crescimento de *Anabaena* sp. nos três tratamentos de salinidade não variou significativamente (Fig.5), bem como o tempo de duplicação da biomassa, baseado na contagem celular. Para todos os tratamentos o dia 2 foi considerado o início do crescimento, enquanto que o fim do crescimento, e início da fase estacionária foi considerado o dia 28 para BG11° ($T_2=5,6038$ dias), 34 para BSN° ($T_2=6,1388$ dias) e 32 para ASN3° ($T_2=5,1476$ dias).

Assim como o crescimento celular, o teor de clorofila-*a* (Fig.6), e o tempo para duplicação da biomassa, baseado no teor de clorofila *a* (Fig.7), também mostraram o mesmo padrão de crescimento independente do tratamento. No entanto, diferente da densidade celular, o teor de clorofila-*a* não evidenciou fase estacionária no fim do experimento (Fig. 6). Quanto ao T_2 , após o oitavo dia de experimento o tempo de duplicação da biomassa ultrapassou quatro dias nos três tratamentos, deixando de ser um crescimento exponencial (Fig.7).

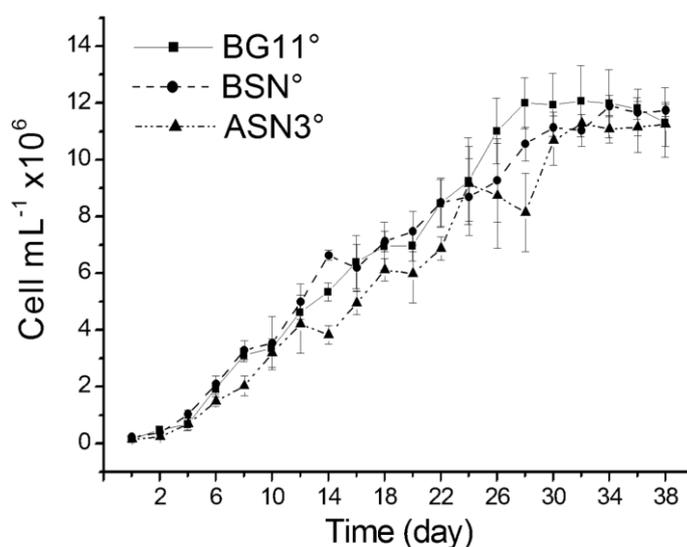


Figura 5. Contagem celular de culturas de *Anabaena* sp. nos tratamentos com salinidade $\cong 0$ (BG11°), $\cong 15$ (BSN°) e $\cong 30$ (ASN3°).

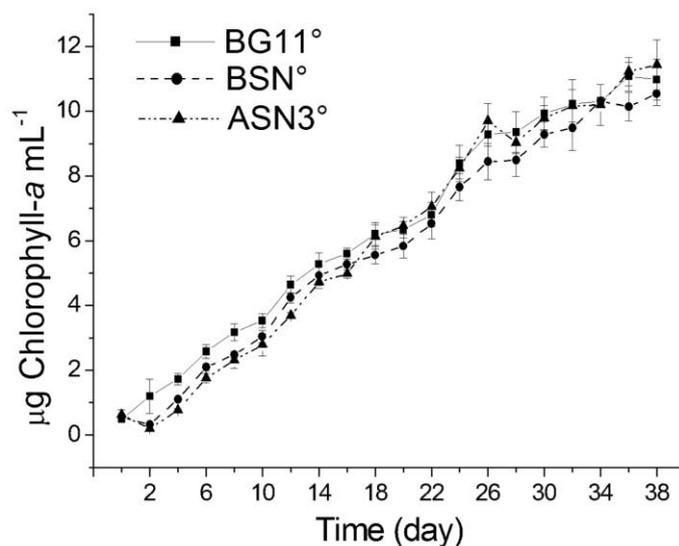


Figura 6. Teor de Clorofila-*a* de culturas de *Anabaena* sp. nos tratamentos com salinidade $\cong 0$ (BG11°), $\cong 15$ (BSN°) e $\cong 30$ (ASN3°).

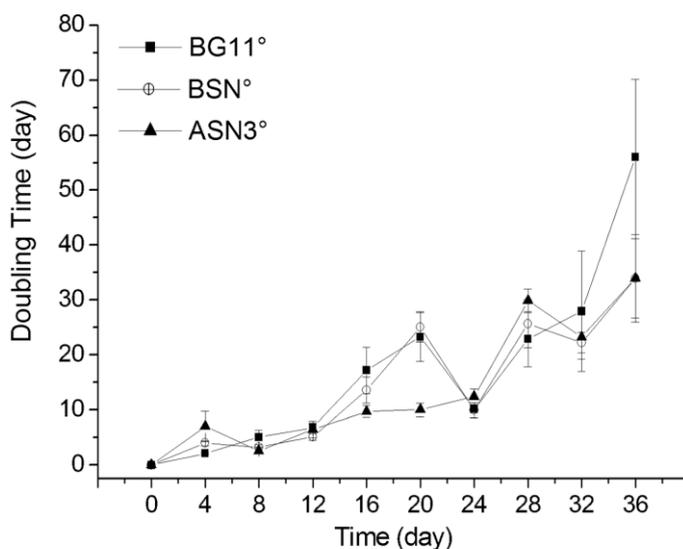


Figura 7. Tempo de duplicação da biomassa (T_2) baseado no teor de clorofila-*a* ao longo da curva de crescimento de *Anabaena* sp. em três salinidades diferentes (BG11°=0; BSN°=15; e ASN3°=30)

Os tratamentos mostraram diferenças na formação de células diferenciadas em heterocitos (Fig.9) e acinetos (Fig.8). Os três tratamentos apresentaram valores similares até o dia 10 (Fig.8). A partir do dia 10, os tratamentos com BG11° e BSN° apresentaram aumento na densidade de acinetos, que estabilizou apenas entre os dias 30 e 32 (Fig.8).

Por outro lado, ASN3° manteve seus valores baixos e estáveis ao longo dos 38 dias de experimento (Fig.8).

A razão de células vegetativas por heterocitos apresentou valores similares até o dia 4, incluindo uma redução da razão entre o dia 0 e o dia 2, e um aumento da mesma do dia 2 ao 4. A partir do dia 4 houve um aumento da razão para os tratamentos com salinidade (Fig.9). Os maiores valores de razão entre células vegetativas e heterocitos foram em ASN3°, onde aumentou gradativamente até o fim do experimento. Os valores mais baixos foram observados em BG11°, onde os resultados foram estáveis a partir do dia 10, e valores intermediários foram observados em BSN°, com valores estáveis a partir do dia 8 (Fig.9).

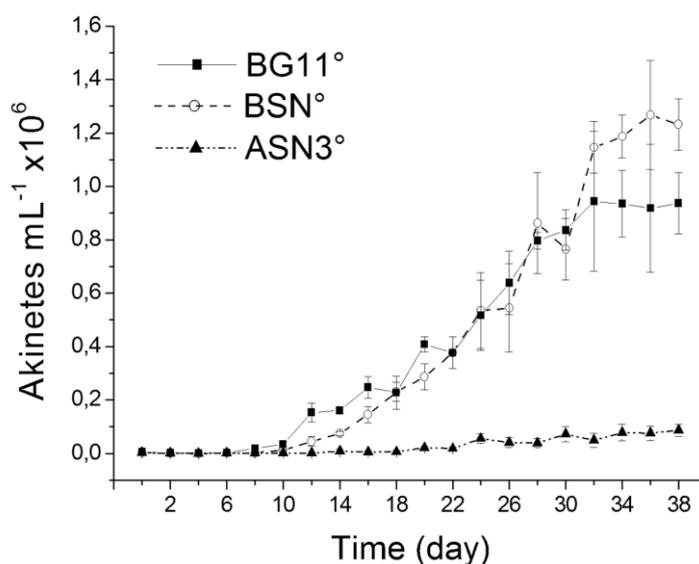


Figura 8. Contagem de Acinetos de culturas de *Anabaena* sp. nos tratamentos com salinidade $\cong 0$ (BG11°), $\cong 15$ (BSN°) e $\cong 30$ (ASN3°).

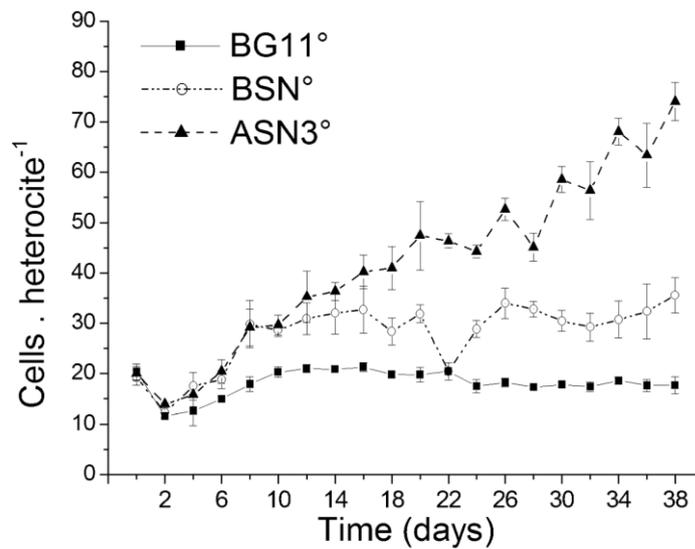


Figura 9. Razão de Células Vegetativas por Heterocitos de culturas de *Anabaena* sp. nos tratamentos com salinidade $\cong 0$ (BG11°), $\cong 15$ (BSN°) e $\cong 30$ (ASN3°).

Os resultados de ARA apresentaram valores maiores de Etileno reduzido no primeiro dia para a cepa que estava crescendo em meio BG11° (Fig.10A-B), e no segundo dia para as culturas com BSN° (Fig.10C-D) e ASN3° (Fig.10E-F). No entanto, os maiores valores foram observados para as culturas em ASN3°. Para o tratamento em BG11°, a exposição ao meio de cultura BSN° por uma hora durante o ARA não alterou o resultado no dia 0 de crescimento, mas sustentou valores maiores no dia 2 (Fig.10A-B). No tratamento com BSN°, a exposição ao meio BG11° durante o ARA não alterou a produção de etileno (Fig.10C-D). Por outro lado, a exposição da cultura com ASN3° a BG11° durante o ARA levou a valores menores de redução de acetileno no dia 2 (Fig.10E-F).

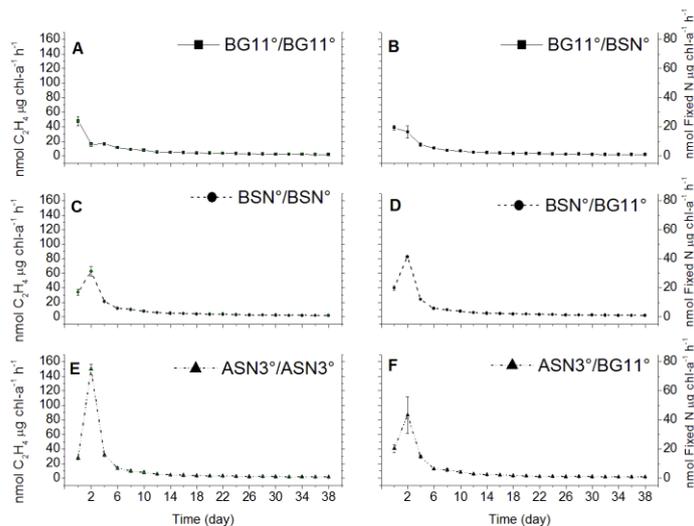


Figura 10. Redução de Acetileno e Fixação de moléculas de nitrogênio de culturas de *Anabaena* sp. nos tratamentos com salinidade $\cong 0$ (BG11°), com exposição de uma hora ao BG11° (BG11°/BG11°) e ao BSN° (BG11°/BSN°); $\cong 15$ (BSN°), com exposição de uma hora ao BSN° (BSN°/BSN°) e ao BG11° (BSN°/BG11°); e $\cong 30$ (ASN3°), com exposição de uma hora aos ASN3° (ASN3°/ASN3°) e ao BG11° (ASN3°/BG11°).

O conteúdo de carbono orgânico e nitrogênio total da biomassa, não variaram significativamente entre os tratamentos, flutuando por volta de 17 μM e 3 μM , respectivamente (Fig. 11). No entanto, o resultado de peso seco de *Anabaena* sp. nos tratamentos com diferentes salinidades foi significativamente diferente, aumentando quatro vezes da salinidade zero para 15 e até 7 vezes da zero para 30 (Fig.11). Por outro lado, quando comparados o conteúdo de carbono orgânico e nitrogênio total por peso seco da cultura de *Anabaena* sp., é possível perceber o aumento de conteúdo de carbono orgânico e a redução do nitrogênio total nos tratamentos com maior salinidade (Fig. 12). Os resultados de nitrogênio total incrementado não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e apresentaram grande variação (Fig. 13A-C), embora dentro do mesmo intervalo de variação dos resultados de moléculas de nitrogênio fixadas pela enzima nitrogenase (Fig. 10).

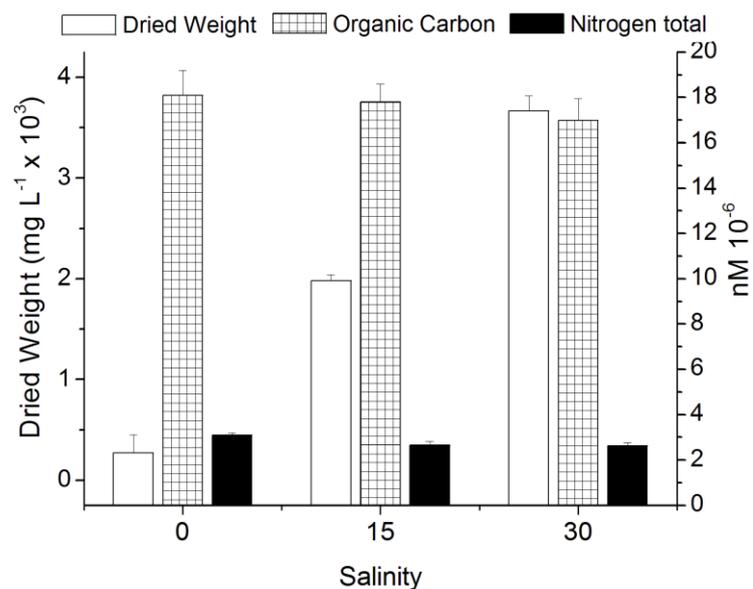


Figura 11. Análise de Carbono Orgânico e Nitrogênio total do peso seco de *Anabaena* sp. nos tratamentos com salinidade $\cong 0$ (BG11 $^\circ$), $\cong 15$ (BSN $^\circ$) e $\cong 30$ (ASN3 $^\circ$).

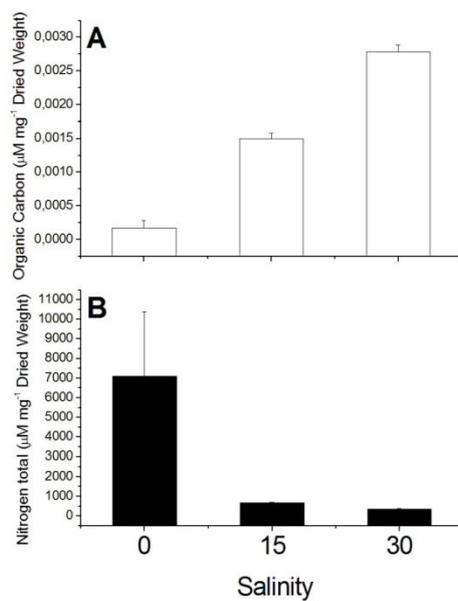


Figura 12. Carbono Orgânico (A) e Nitrogênio total (B) por peso seco de *Anabaena* sp. nos tratamentos com salinidade $\cong 0$ (BG11 $^\circ$), $\cong 15$ (BSN $^\circ$) e $\cong 30$ (ASN3 $^\circ$).

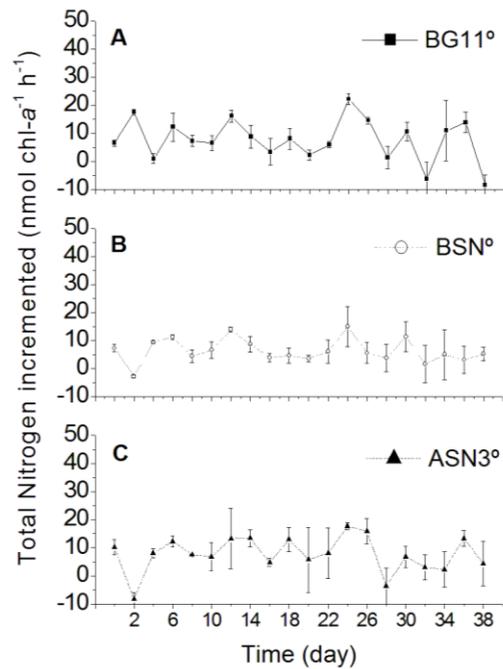


Figura 13. Nitrogênio total do peso seco da cultura de *Anabaena* sp. nos tratamentos com salinidade $\cong 0$ (BG11°), $\cong 15$ (BSN°) e $\cong 30$ (ASN3°). Dados calculados com base no Nitrogênio total do 30º dia de experimento.

4. Discussão

4.1. Experimento 1

Embora os resultados do experimento 1 tenham mostrado valores similares, foi possível observar que em média, os valores de teor de clorofila-*a* para o tratamento com filtro foram menores do que sem filtro. Isto pode ter ocorrido, pois para obter as devidas concentrações, foram utilizados processos diferentes de diluição e concentração, como descrito nos métodos. No entanto, o tratamento com filtro apresentou em média valores de ARA por mg chl-*a*⁻¹ maiores. Assim como observado por Staal *et al.* (2001), a significativa correlação entre Acetileno reduzido e teor de clorofila-*a*, indica que em ambos os tratamentos o auto-sombreamento e outros fatores interferentes, como a depleção de oxigênio acumulado, não estão ocorrendo.

De acordo com os resultados, ambos os métodos são válidos, pois obtiveram alta correlação entre ARA e teor de clorofila-*a*. No entanto, no tratamento sem filtro o Acetileno demora mais a chegar até o heterocito, pois há uma lâmina de meio de cultura mais espessa por onde ele precisa difundir até chegar ao heterocito. Por outro lado, no tratamento com filtro, foi utilizada uma quantidade menor de meio de cultura, apenas para evitar a dessecação, o que facilita a difusão de gases para o heterocito. Portanto, para o experimento 2 optou-se por utilizar a metodologia do tratamento com filtro, pois nele o efeito da difusão dos gases pelo meio líquido é reduzido, e a disposição das células esta mais coerente com a sua ocorrência natural, em tapetes microbianos.

4.2.Experimento 2

As curvas de crescimento, teor de clorofila e tempo de duplicação da biomassa para os três tratamentos indica que o crescimento não foi limitado pela salinidade, ainda que a cepa estivesse aclimatada ao meio com salinidade próxima a zero. Independente da salinidade a cepa atingiu crescimento exponencial significativo apenas entre os dias 0 e 8, e assim como a lenta taxa de crescimento, foi provavelmente influenciada pela alta demanda energética do metabolismo diazotrófico.

Ao fim do experimento a luz foi um dos fatores limitantes devido ao auto-sombreamento. Culturas de cianobactéria em condições de competição por luz podem aumentar o teor de clorofila por célula como estratégia competitiva (Nobel *et al.*, 1998). Diferente da curva de contagem celular, a curva de clorofila-*a* não apresentou fase estacionária, e o conseqüente aumento no teor de clorofila por célula ocorreu devido à competição por luz.

O alto tempo necessário para a duplicação da biomassa pode estar relacionado ao metabolismo do nitrogênio. A fixação de nitrogênio atmosférico tem um alto custo

energético, especialmente no metabolismo deste nitrogênio, mas também na diferenciação de células vegetativas em heterocito (Guerrero & Lara, 1987). As taxas de crescimento em diferentes condições de disponibilidade de nitrogênio podem variar de acordo com as espécies. *Cylindrospermopsis raciborskii* em meio de cultura contínuo não apresentou variações nas taxas de crescimento, mas sim variações morfológicas (Sprober *et al.*, 2003). No entanto a tolerância a salinidade no gênero *Anabaena* tem sido relatada (Moisander *et al.*, 2002). Em uma série de experimentos com *Anabaena flos-aquae*, esta apresentou variações no tamanho de células, conteúdo de carbono, taxa de crescimento, densidade e características morfológicas (Rhe & Lederman, 1983; Layzel *et al.*, 1985; Turpin *et al.*, 1985; Lee & Rhee, 1997; Shafik *et al.*, 2003).

As principais diferenças no crescimento de *Anabaena* sp. nos três tratamentos foi quanto a densidade de acinetos e a razão heterocítica. A presença de acinetos é um indicador de condições não favoráveis de crescimento, sendo capazes de permanecer em dormência por anos até que as condições de crescimento voltem a ser as ideais (Kaplan-Levy *et al.*, 2010; Komarèk, 2013). Apesar de a cepa estar inicialmente aclimatada ao meio com salinidade zero, esta não só apresentou rápida aclimação ao meio salino, evidenciada por curvas de crescimento similares, mas também apresentou preferência pelo meio com maior salinidade, onde a densidade de acinetos foi menor.

Geralmente a ocorrência e quantidade de heterocitos estão associadas a diferentes fatores ambientais (fixação aeróbica de nitrogênio, ausência ou concentração insuficiente de nitrato, compostos orgânicos, temperatura entre outros) (Komarèk, 2013) e às vezes a razão heterocítica é usada como indicador se a cepa está ou não utilizando o metabolismo diazotrófico para promover crescimento. Dentre estes, o fator crucial é a presença de nitrogênio, mas nossos resultados também mostram outro fator importante, a salinidade. Nos tratamento com salinidade, mas especialmente naquele com maior

salinidade, a razão entre células vegetativas e heterocitos foi menor. A frequência heterocítica não pode ser utilizada para inferir se o crescimento da cepa é dependente ou não da fixação de nitrogênio, uma vez que é determinada por fatores ambientais e genéticos (Wolk *et al.*, 2004). Em nosso tratamento com salinidade 30 a razão heterocítica foi menor que 20 apenas até o oitavo dia, aumentando gradativamente até o fim do experimento, onde atingiu o valor de 60 células vegetativas para cada heterocito. Neste experimento a única fonte de nitrogênio foi o N₂, assim como nos tratamentos com menor salinidade, mas que durante todo o experimento apresentaram razão heterocítica menores que 30 para salinidade 15 e menores que 20 para salinidade zero.

Apesar da diferença significativa em número de heterocitos, os resultados de ARA apresentaram valores muito similares para os diferentes tratamentos. Isso indica que os heterocitos no tratamento de baixa salinidade estão trabalhando abaixo de sua capacidade máxima. No tratamento com maior salinidade menos heterocitos foram capazes de reduzir uma quantidade similar de Acetileno. Este resultado difere de alguns artigos que mostram que o estresse osmótico e iônico podem inibir a fixação de nitrogênio com o aumento da salinidade (Fernandes *et al.*, 1993). No entanto, alguns experimentos mostram que a resposta varia com a espécie, e eventualmente com o ambiente de onde esta foi isolada (Moisander *et al.*, 2002). Os resultados de ARA foram confirmados pelos valores de nitrogênio total incrementado por hora à biomassa da cultura. Embora estes dois resultados não tenham apresentado o mesmo padrão de distribuição, eles tiveram valores similares.

Anabaena sp. foi isolada de um estuário cuja salinidade ao longo do ano pode variar entre 0 e 34, o que justifica sua adaptabilidade a diferentes salinidades. No entanto, para manter a fixação de nitrogênio em um ambiente microaeróbico espécies heterocitadas possuem pelo menos duas estratégias: (1) o envoltório do heterocito serve

como barreira para evitar a difusão dos gases (Wolk *et al.*, 2004) e as principais trocas são controladas por microplasmodesmas que conectam o heterocito às células adjacentes (Walsby, 2007); e (2) o aparato respiratório dentro do heterocito reduz a concentração de O₂ além de gerar energia para sustentar a alta demanda de ATP durante a fixação de nitrogênio (Wolk *et al.*, 2004).

Desta forma, a maior eficiência na fixação de nitrogênio na maior salinidade pode ser explicada por duas hipóteses, ou mesmo por ambas: (1) redução do coeficiente de difusão de gases na água em decorrência do aumento da salinidade; e (2) maior eficiência na remoção de O₂ intracelular. De acordo com a primeira hipótese a salinidade diminui a difusão dos gases em meio líquido (Ramsing & Gundersen, 2013; Garcia & Gordon, 1992), aumentando a eficiência da espessa parede celular em evitar a entrada de O₂ no heterocito. Por outro lado, a eficiência desta barreira não pode ser tão alta a ponto de impedir a entrada de N₂ em quantidade suficiente para saturar a nitrogenase, pois o fluxo molar de N₂ para dentro do heterocito é similar ao de O₂. O que assegura que a concentração de N₂ seja maior que a de O₂ é a respiração dentro do heterocito (Walsby, 2007). Desta forma a menor difusão dos gases, associado aos mecanismos de remoção do O₂ de dentro do heterocito aumentaram a eficiência heterocítica e diminui o custo energético da fixação de nitrogênio em condições de água salobra e salgada.

Os resultados de ARA mostraram o aumento da redução de acetileno durante a aclimação da cepa ao meio salino (entre o segundo e quarto dia de experimento), mas também no estresse salino positivo, quando a cepa foi exposta por uma hora ao meio com salinidade maior do que inoculo inicial. Segundo Walsby (2007) a difusão de gases para dentro de heterocitos pode ocorrer em questão de segundos, e um heterocito com vesículas de gás colapsadas pode reconstruí-las rapidamente. Se a difusão dos gases for

reduzida, como por exemplo, pelo aumento da salinidade, possivelmente os mecanismos de controle da concentração de O₂ dentro do heterocito se tornam mais efetivos, ainda que a exposição a maior salinidade seja por apenas 1h.

De acordo com a segunda hipótese, deve haver uma maior eficiência nos mecanismos de remoção de O₂ intracelular em contrapartida da maior eficiência das barreiras heterocíticas. Portanto, o acúmulo de carboidratos intracelular como forma de osmorregulação (Reed *et al.*, 1984) pode ter aumentado a capacidade de respiração de *Anabaena* sp.. Uma das estratégias para reduzir a concentração de oxigênio dentro dos heterocitos é pela respiração, alimentada pela quebra de carboidratos. A respiração dentro do heterocito assume dupla função: reduzir a concentração de O₂ e produzir ATP para sustentar a fixação de N₂ (Wolk *et al.*, 2004). Conseqüentemente a efetiva criação de um ambiente microaeróbico aumenta a capacidade da enzima nitrogenase. O peso seco das culturas em maior salinidade foram de 3 a 7 vezes maiores, e apesar de nossas análises não sustentarem esta afirmação, isto pode ter ocorrido devido ao maior acúmulo intracelular de osmólitos. O acúmulo de compostos orgânicos não tóxicos, também chamados osmoprotetores ou solutos compatíveis, é uma dos mecanismos mais utilizados por cianobactérias contra o estresse salino. Estes compostos orgânicos são produzidos a partir do carbono fotossinteticamente fixado, fontes primárias de carbono e glicogênino endógeno, e não existe um composto universal, ou seja, o osmoprotetor produzido depende de cada espécie (Reed *et al.*, 1986; Bhargava e Srivastava, 2013). Isto pode explicar os valores mais altos de carbono orgânico por peso seco no meio salobro e salino.

Por outro lado, meios de cultura com baixa salinidade aumentam a difusão dos gases, diminuindo a eficiência do envelope heterocítico em evitar a entrada de O₂ e possivelmente a liberação de exopolissacarídeos. Em tais condições *Anabaena* sp.

produziu mais heterocitos, e possivelmente nitrogenase, para compensar a baixa eficiência heterocítica. Entre os possíveis gastos energéticos associados a estas condições estão o maior consumo de carboidratos na respiração dentro do heterocito (o que justifica os resultados mais baixos de carbono orgânico por peso seco) e o “custo capital” da produção de heterocitos (Scherer & Böger, 1982; Ernst & Böger, 1985; Wolk *et al.*, 2004), que pode se aproximar da metade do fluxo de elétrons gerado pela fotossíntese em um tricoma (Turpin *et al.*, 1985; Murry & Wolk, 1989). A respiração dentro de heterocitos é tão necessária que pode corresponder a mais da metade de toda respiração feita em um tricoma, apesar do menor número de heterocitos em relação a células vegetativas (Murry & Wolk, 1989). A menor eficiência heterocítica em manter um ambiente intracelular microanaeróbico leva a uma maior produção de heterocitos devido a necessidade de fixar nitrogênio diante da ausência de fontes de amônio e nitrato.

A salinidade é vista como um dos principais fatores limitantes de florações de cianobactérias diazotróficas, especialmente em estuários, levando ao estresse iônico e osmótico, que podem afetar de forma diferente o metabolismo de cianobactérias (Fernandes *et al.* 1993). No entanto, como grupo de grande distribuição ambiental, as cianobactérias apresentam diferentes resposta a salinidade, e algumas podem apresentar alta adaptação a variações de salinidade, especialmente pela produção de osmólitos (Reed *et al.*, 1984).

Artigos com comunidades de tapetes microbianos mostram que a salinidade pode reduzir a ocorrência de espécies diazotróficas (Severin *et al.*, 2012; Bolhuis *et al.*, 2013). No entanto, a cepa utilizada em nosso experimento foi isolada de uma região estuarina, onde ela ocorre durante todo ano associada ao sedimento na zona intermareal. Neste ambiente ela precisa estar apta a sobreviver em salinidades que variam de

aproximadamente 0 até 30. Os resultados do experimento confirmam sua capacidade de osmoregulação, e até mesmo uma preferência pelo meio salino, evidenciada pela densidade de acinetos e maior eficiência na fixação de nitrogênio.

5. Conclusão

A utilização de uma cepa adaptada à variação de salinidade, ou seja, cujas taxas de crescimento não se alteraram com a variação de salinidade, permitiu a observação de um efeito secundário da salinidade sobre a atividade nitrogenase, diferente dos estresse iônico e osmótico comumente citados. A salinidade reduz a difusão de gases para dentro de heterocitos, permitindo assim uma maior eficiência da enzima nitrogenase. Como consequência, a cepa produz menos heterocitos, o que significa economia de energia química.

Considerações Finais

Os tapetes microbianos são comunidades que vêm sendo estudada ao longo de décadas especialmente no que diz respeito ao seu metabolismo e suas interações com o ambiente físico. No entanto, há uma grande desproporcionalidade no esforço de estudos no hemisfério norte se comparado ao Sul. Os poucos estudos com tapetes da América do Sul são da última década, e já mostram algumas diferenças sazonais quando comparados com tapetes do hemisfério Norte, que ocorrem frequentemente apenas nos meses mais quentes. Em nossos resultados a presença dos tapetes foi observada em todas as estações, e as maiores densidades ocorreram especialmente relacionadas à maior umidade do ar e menor erosão, promovida pela intensidade e direção dos ventos, características relacionadas às estações frias.

Naturalmente, outras características assemelham com àquelas de tapetes do Hemisfério Norte, tais como a composição, principalmente dominados por cianobactérias filamentosas, heterocitadas ou não e diatomáceas penadas. A composição do tapete é afetada pela zona intermareal onde ele ocupa. Na zona intermareal superior os tapetes ficam menos expostos a erosão, e frequentemente associados à fanerógamas, possibilitando a ocorrência de comunidades mais complexas, estáveis e com maior teor de clorofila e proteína. Na zona intermareal mediana a comunidade de tapete fica exposta a forças físicas que aumentam a erosão, evidenciada pela observação de MISS.

Por se tratar de uma comunidade exposta a condições de estresse (e.g. variações nas condições de dessecação, salinidade e erosão), os organismos que a compõe devem estar bem adaptados a estas condições. Nossos experimentos utilizando uma cepa de *Anabaena* sp. mostraram que esta não alterou sua taxa de crescimento em detrimento

das variações de salinidade sem fonte de nitrogênio. Isto mostra uma adaptação às condições de variação de salinidade, e a partir disto foi possível observar um efeito secundário da salinidade sobre a atividade nitrogenase, diferente dos estresse iônico e osmótico comumente citados. A salinidade reduz a difusão de gases para dentro de heterocitos, permitindo assim uma maior eficiência da enzima nitrogenase. Como consequência, a cepa produz menos heterocitos, o que significa economia de energia química.

Referências Bibliográficas

- Abed R M M, Kohls K, Schoon R, Scherf A, Schacht M, Palinska KA, Al-Hassani H, Hamza W, Rullkötter J and Golubic S Lipid biomarkers, pigments and cyanobacterial diversity of microbial mats across intermareal flats of the arid coast of the Arabian Gulf (Abu Dhabi, UAE). *FEMS Microbiol Ecol* 2008; 65 :449–62.
- Abed RMM, Kohls K and de Beer D. Effect of salinity changes on the bacterial diversity, photosynthesis and oxygen consumption of cyanobacterial mats from an intermareal flat of the Arabian Gulf. *Environ Microbiol*, 2007; 9(6):1384-92.
- Abed RMM, Kohls K, Palinska KA and Golubic S. Diversity and Role of Cyanobacteria and Aerobic Heterotrophic Microorganisms in Carbon Cycling in Arid Cyanobacterial Mats. In: Seckbach J and Oren A. *Microbial Mats: Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, Dordrecht: Springer, 2010, 253-73.
- Admiraal W. The ecology of estuarine sediment-inhabiting diatoms. In: Round FE & Chapman DJ (eds) *Progress in Phycological Research*. Vol. 3. Bristol: Biopress, 1984, 269-322.
- Alain K, Zbinden M, Le Bris N, Lesongeur F, Quérellou J, Gaill F and Cambon-Bonavita M. Early steps in microbial colonization processes at deep-sea hydrothermal vents. *Environ Microbiol*, 2004; 6 (3):227–241. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00557.x
- Aminot A, Krouel R and Coverly SC. Nutrients in seawater using segmented ow analysis. In: *Practical guidelines for the analysis of seawater*. In: Wurl O. *Practical Guidelines for the Analysis of Seawater*. CRC Press, 2009.

- Badger M R and Price G D. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J Exp Bot*, 2003; 383 (54): 609-622. DOI: 10.1093/jxb/erg076
- Badger MR, Price G D, Long B M and Woodger F J. The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *J Exp Bot*, 2006. 57(2): 249–265. doi:10.1093/jxb/eri286
- Baker PD & Bellifemine D. Environmental influences on akinete germination of *Anabaena circinalis* and implications for management of cyanobacterial blooms. *Hydrobiologia*, 2000; 427: 65–73.
- Baumgarten MGZ. Avaliação do *Balanus improvisus* como indicador dos níveis metálicos do estuário da Lagoa dos Patos (RS-Brasil). M.S. Thesis, Universidade do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil, 1987.
- Baumgartner L K, Reid R P, Dupraz C, Decho A W, Buckley D H, Spear J R, Przekop K M, Visscher P T. Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms, new discoveries. *Sediment Geol*, 2006. 185:131–145.
- Bebout BM, Fitzpatrick MW and Paerl HW. Identification of the Sources of Energy for Nitrogen Fixation and Physiological Characterization of Nitrogen-Fixing Members of a Marine Microbial Mat Community. *Appl Environ Microbiol*, 1993;59(5):1495-1503.
- Bhargava P, Srivastava A (2013) Salt toxicity and survival strategies of cyanobacteria. In: Srivastava AK, Rai AN, Neilan BA (eds) *Stress biology of cyanobacteria*. CRC Press, Boca Raton, pp 171–188
- Bicudo CEM and Menezes M, 2006. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. Chave para identificação e descrições. RIMA ed., São Carlos: 502 pp.

- Bini LM. Análises multivariadas e limnologia: exploração, síntese e inferência de um mundo aquático complexo, p. 73-107. In: Bicudo CEM and Bicudo DC (eds.) Amostragem em Limnologia. Brazil: RIMA ed., 2007.
- Blackburn SI, McCausland MA, Bolch CJS, Newman SJ & Jones GJ. Effect of the Salinity on Growth and Toxin production in Cultures of the Bloom-forming Cyanobacterium *Nodularia spumigena* from Australian Waters. *Phycologia*, 1996; 35(6): 511-22.
- Bolhuis H, Fillinger L & Stal LJ. Coastal Microbial Mat Diversity along a Natural Salinity Gradient. *PLOS ONE* 2013; 8(5): e63166.
- Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*, 1976. 72:248-254.
- Brendan B P, Walter M R and Neilan B A. MICROBIAL COMMUNITIES OF STROMATOLITES. In: Sekbach J and Walsh M (Eds). Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology: From Fossils to Astrobiology. Springer, 2009
- Brotas Y, Cabrita T, Portugal A, Serôdio & Catanno F. Spatio-temporal distribution of the microphytobenthic biomass in intermareal flats of Tagus Estuary (Portugal). *Hydrobiologia* 1995; 300/301: 93-104.
- Coelho H, Vieira S., Serôdio J. Effects of desiccation on the photosynthetic activity of intermareal microphytobenthos biofilms as studied by optical methods. *J Exp Mar Biol Ecol* 2009; 381:98–104.
- Cohen Y. Photosynthesis in cyanobacterial mats and its relation to the sulfur cycle: a model for microbial sulphur interactions. In: Cohen Y and Rosenberg E (eds.), *Microbial Mats. Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities*. Washington, DC, ASM, 1989.

- Colijn FC and Dijkema KS. Species composition of benthic diatoms and distribution of chlorophyll-a on an intermareal flat in the Dutch Wadden Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 1981; 4:9-21.
- Croasdale H, Bicudo CEM, Prescott GW, 1983. A synopsis of North American desmids. II. Desmidiaceae: Placodermae 5. The filamentous genera. University of Nebraska Press, Lincoln/London: 117 pp.
- Crowe J H, Hoekstra F A and Crowe L M. Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol*, 1992; 54:579-99.
- Cuadrado D & Pizani N. Identification Of Microbially Induced Sedimentary Structures Over A Tidal Flat. *Lat Am J Sedimentol Basin Anal* 2007; 14(2):105-16.
- Cuadrado DG, Bournod CN, Pan J, Carmona, NB. Microbially-induced sedimentary structures (MISS) as record of storm action in supratidal modern estuarine setting. *Sediment Geol* 2013; 296:1-8.
- Cuadrado DG, Carmona NB & Bournod C. Biostabilization of sediments by microbial mats in a temperate siliciclastic tidal flat, Bahia Blanca estuary (Argentina). *Sediment Geol* 2011; 237:95–101.
- Cuadrado DG, Perillo GME & Vitale AJ. Modern microbial mats in siliciclastic tidal flats: Evolution, structure and the role of hydrodynamics. *Mar Geol* 2014; 352:367–80.
- Decho AW. Exopolymers in microbial mats: Assessing their adaptive roles. *In: Stal LJ and Coumette P (eds) Microbial Mats. Springer, 1994*
- Decho AW. Microbial biofilms in intermareal systems: an overview. *Cont Shelf Res*, 2000; 20:1257-1273.
- Defant F. *Physical Oceanography Volume II*. London: Pergamon Press, 1961.

- Des Marais DJ. Biogeochemistry of Hypersaline Microbial Mats Illustrates the Dynamics of Modern Microbial Ecosystems and the Early Evolution of the Biosphere. *Biol Bull*, 2003; 204: 160–167.
- Doemel WN and Brock TD. Structure, Growth, and Decomposition of Laminated Algal-Bacterial Mats in Alkaline Hot Springs. *Appl Environ Microb*, 1977; 34(4):433-452.
- Doran PT, Gordon DA, Lanoil BD, Pinckney JL. Perennial Antarctic Lake Ice: An Oasis for Life in a Polar Desert. *Science*, 1998; 280: 2095-8.
- Dose K, Bieger-Dose A, Dillman R, Gill M, Kerz O, Klein A, Meinert H, Nawroth T, Risi S and Stridde C. Era-Experiment “Space Biochemistry”. *Adv Space Res*, 1995; 16(8):119-29.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugar Related Substances. *Analyt Chem* 1956; 28:350-6.
- Eckman JE, Andres MS, Marinelli RJ, Bowlin E., Reid RP, Aspden RJ & Paterson DM. Wave and sediment dynamics along a shallow subtidal sandy beach inhabited by modern stromatolites. *Geobiology*, 2008; 6:21–32. DOI 10.1111/j.1472-4669.2007.00133.x
- Edler L and Elbrachter M. The Utermohl Method for Quantitative Phytoplankton Analysis. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 2010.
- Epping EHG, Khalili A and Thar R. Photosynthesis and the dynamics of oxygen consumption in a microbial mat as calculated from transient oxygen microprofiles. *Limnol Oceanogr*, 1999; 44(8):1936-48.
- Ernst A and Böger P. Glycogen accumulation and the induction of nitrogenase activity in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J Gen Microbiol*, 1985; 131:3147–3153.

- Fagherazzi S, Mariotti G, Banks AT, Morgan EJ and Fulweiler RW. The relationships among hydrodynamics, sediment distribution, and chlorophyll in a mesotidal estuary. *Estuar Coast Shelf S* 2014; 144:54-64.
- Faithfull CL and Burns CW. Effects of salinity and source of inocula on germination of *Anabaena akinetes* from a tidally influenced lake. *Freshwater Biol* 2006; 51: 705–716.
- Fenchel T. Formation of Laminated Cyanobacterial Mats in the Absence of Benthic Fauna. *Aquat Microb Ecol* 1998; 14:235-40.
- Fernandes TA, Iyer V & Apte SK. Differential Responses of Nitrogen-Fixing Cyanobacteria to Salinity and Osmotic Stresses. *Appl Environ Microb* 1993; 59(3):899-904.
- Flores E, Herrero A. Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. In: Bryant, DA (Ed.), *The Molecular Biology of Cyanobacteria.*, Dordrecht, Kluwer Scientific Publications, 1994.
- Foster MH, Zhang Y and Clark AG. Deconstructing B cell tolerance to basement membranes. *Arch Immunol Ther Exp* 2006; 54:1–11.
- Franks J and Stolz JF. Flat laminated microbial mat communities. *Earth-Sci Rev*, 2009; 96:163–172.
- Gallon JR. Reconciling the incompatible: N₂ fixation And O₂. *New Phytol*, 1980; 122:571-609.
- Garcia HE and Gordon LI. Oxygen solubility in seawater: Better fitting equations. *Limnol Oceanogr* 1992; 37(6):1307-12.
- Gemerden H. Microbial mats: A joint venture. *Mar Geol* 1993; 113:3-25.

- Gerdes G. What are Microbial Mats? In: Seckbach, J. & Oren, A. *Microbial Mats: Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Dordrecht: Springer, 2010, 289-302.
- Giordano M, Beardall J and Raven JA. CO₂ Concentrating Mechanisms in Algae: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution. *Annu Rev Plant Biol*, 2005; 56:99–131.
- Gladis-Schmacka F, Glatzel S, Karsten U, Böttcher H and Schumann R. Influence of local climate and climate change on aeroterrestrial phototrophic biofilms. *Biofouling*, 2014; 30(4):401–14.
- Golubic S, Lee S and Browne K. Cyanobacteria: Architects of sedimentary structures. *In: Riding R & Awramik S (eds.) Microbial Sediments*. Berlin, Springer-Verlag, 2000, 57–67.
- Graco M, Farías L, Molina V, Gutiérrez D and Nielsen LP. Massive Development of microbial mats following phytoplankton blooms in a naturally eutrophic bay: implications for nitrogen cycling. *Limnol Oceanogr*, 2001; 46(4):821-32.
- Grootjans AP, van den Ende FP & Walsweer AF. The role of microbial mats during primary succession in calcareous dune slacks: an experimental approach. *J Coast Conservat* 1997; 3:95-102.
- Guerrero MG & Lara C. Assimilation of inorganic nitrogen. *In: Fay P & Van Baalen C (Eds). The Cyanobacteria*. Amsterdam: Elsevier Science, 1987, 4376-8.
- Guillard, RRL. Division rates. *In Stein (ed), Handbook of Phycological Methods*, V. 1, Cambridge University Press, Cambridge, 1973, 289-312.
- Guimarães PS, Zigiotta L, Garcia M, Dellamano-Oliveira MJ, Vieira AAH & Giroldo D. Phytoplankton relationship with bacterioplankton, dissolved carbohydrates and water characteristics in a subtropical coastal lagoon. *J Limnol* 2013; 72(3):543-54.

- Hall BG. Phylogenetic trees made easy: a how-to manual. 4th ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2011.
- Hammer Ø, Harper DAT and Ryan PD. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia* 2001; 4:1-9.
- Hoehler TM, Bebout, BM and Des Marais DJ. The role of microbial mats in the production of reduced gases on the early Earth. *Nature*, 2001; 412:324-7.
- Houchins JP . The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1984; 768:227-255.
- Howarth RW, Marina R, Lane J and Cole JJ. Nitrogen fixation in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. 1. Rates and importance. *Limnol Oceanogr*, 1998; 33(4):669-87.
- Jacqs V, Ridame C, L'Helguen S, Kaczmar F and Saliot A. Response of the Unicellular Diazotrophic Cyanobacterium *Crocospaera watsonii* to Iron Limitation. *Plos one*, 2014; 9(1):1-9.
- Jensen BB and Cox RP. Effect of oxygen concentration on dark nitrogen fixation and respiration in cyanobacteria. *Arch Microbiol*, 1983; 135: 287–292
- Jochum T, Reddy CM, Eichhöfer A, Buth G, Szmytkowski J, Kalt H, Moss D and Balaban TS. The supramolecular organization of self-assembling chlorosomal bacteriochlorophyll c, d, or e mimics. *PNAS*, 2008; 105(35):12736-41.
- Jodo M, Kawamoto K, Tochimoto M, Coverly SC. Determination of nutrients in seawater by segmented-ow analysis with higher analysis rate and reduced interference on ammonia. *J Autom Chem*, 1992; 14: 163-167.
- Jørgensen BB & Des Marais DJ. Optical properties of benthic photosynthetic communities: Fiber-optic studies of cyanobacterial mats. *Limnol Oceanogr*, 1988; 33(1):99-113.

- Jørgensen BB, Cohen Y and Des Marais DJ. Photosynthetic Action Spectra and Adaptation to Spectral Light Distribution in a Benthic Cyanobacterial Mat. *Appl Environ Microbiol*, 1987; 53(4):879-86.
- Kaplan-Levy RN, Hadas O, Summers ML, Rucker J and Sukenik A. Akinetes: Dormant Cells of Cyanobacteria. In: Lubzens E *et al.* (eds.). *Dormancy and Resistance in Harsh Environments*, Topics in Current Genetics 21, Berlin, Springer, 2010.
- Komárek J, 1983. Contribution to the chlorococcal algae of Cuba. *Nova Hedwigia* 37:65-180.
- Komárek J, Anagnostidis K, 1998. *Cyanoprokaryota. 1. Teil Chroococcales*. Gustav Fischer, Jena: 548 pp.
- Komárek J, Anagnostidis K, 2005. *Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales*. Elsevier/Spektrum, Heidelberg:759 pp.
- Komárek J, Fott B, 1983. [Chlorophyceae (Grünalgen). Ordnung: Chlorococcales]. [Book in German]. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart: 1044 pp.
- Komárek J. The modern classification of Cyanoprokaryotes (Cyanobacteria). *Oceanol Hydrobiol Stud*, 2005; 34(3):5-17.
- Komárek J. Süßwasserflora von Mitteleuropa. *Cyanoprokaryota: 3rd part: heterocystous genera*. Heidelberg: Springer Spektrum, 2013.
- Krumbein WE, Brehm U, Gorbushina AA, Levit G and Palinska KA. Biofilm, biodictyon and biomat – biolaminites, oolites, stromatolites – geophysiology, global mechanism and parahistology, In: Krumbein WE, Paterson DM and Zavarzin GA (eds.) *Fossil and Recent Biofilms*. Kluwer, Dordrecht, 2003.
- Krumbein WE. Stromatolites – the challenge of a term in space and time. *Precambrian Res*, 1983; 20:493–531.

- Lamote M, Johnson LE and Lemoine Y. Photosynthetic responses of an intermareal alga to emersion: The interplay of intermareal height and meteorological conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2012; 428:16–23.
- Layzell DB, Turpin DH and Elrifi IR. Effect of N Source on the Steady State Growth and N Assimilation of P-limited *Anabaena flos-aquae*. *Plant Physiol* 1985; 78:739-45.
- Lee D and Rhee G. Kinetics of Cell Death in the Cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* and the Production of Dissolved Organic Carbon. *J Phycol* 1997; 33:991-8.
- Mackinney G. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J Biol Chem* 1941; 140:315-22.
- Mann PS. *Introductory statistics*. 5th ed. Hoboken : John Wiley and Sons, 2003.
- Manske AK, Glaeser J, Kuypers MMM and Overmann J. Physiology and Phylogeny of Green Sulfur Bacteria Forming a Monospecific Phototrophic Assemblage at a Depth of 100 Meters in the Black Sea. *Appl Environ Microbiol*, 2005; 71(12):8049-8060.
- Mariotti G, Perron JT and Bosak T. Feed backs between flow, sediment motion and microbial growth on sand bars initiate and shape elongated stromatolite mounds. *Earth Planet Sc Lett* 2014;397:93–100.
- Marques WC, Möller OO. Variabilidade Temporal em Longo Período da Descarga Fluvial e Níveis de Água da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. *RBRH* 2008; 13(3):155-63.
- Meeks JC and Elhai J. Regulation of Cellular Differentiation in States and Plant-Associated Symbiotic Growth Filamentous Cyanobacteria in Free-Living.

Microbiol Mol Biol Ver, 2002; 66(1):94-121. DOI: 10.1128/MMBR.66.1.94-121.2002

Moisander PH, McClinton III, E. and Paerl HW. Salinity effects on Growth, Photosynthetic Parameters, and Nitrogenase Activity in Estuarine Planktonic Cyanobacteria. Microb Ecol 2002; 43:432-42.

Möller Jr, OO; Castaing P; Salomon JC and Lazure P. The influence of local and non-local forcing effects on the subtidal circulation of Patos Lagoon. Estuaries 2001; 24(2):297-311.

Möller OO and Castaing P. Hydrographical characteristics of the estuarine area of Patos Lagoon (30°S, Brazil). In: Perillo GMM, Piccolo C and Pino M (eds.), Estuaries of South America: Their Geomorphology and Dynamics. Berlin: Springer Verlag, 1999, 83–100.

Möller OO. Hydrodynamique de La Lagune dos Patos. Me´sures et modelisation. DSc. Thesis, Universite´ Bordeaux I, France, 1996.

Mur LR, Skulberg, OM and Utkilen H. Cyanobacteria In The Environment. In: Chorus I and Bartram J (eds.) Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. WHO, 1999.

Murry MA and Wolk CP. Evidence that the barrier to the penetration of oxygen into heterocysts depends upon two layers of the cell envelope. Arch Microbiol 1989; 151: 469–74.

Nakagawa S, Takai K, Inagaki F, Hirayama H, Nunoura T, Horikoshi K and Sako Y. Distribution, phylogenetic diversity and physiological characteristics of epsilon-Proteobacteria in a deep-sea hydrothermal field. Environ Microbiol, 2005; 7(10):1619-32. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00856.x

- Neu TR. Biofilms and microbial mats, In: Krumbein WE, Paterson DM and Stal LJ (eds.) *Biostabilization of Sediments*. Bibliotheks-Informationssystem BIS, Oldenburg, 1994.
- Neumeier U, Lucas CH and Collins M. Erodibility and erosion patterns of mudflat sediments investigated using an annular flume. *Aquatic Ecol*, 2006; 40:543–54.
- Nichols G. *Sedimentology and Stratigraphy*. 2. ed. [s.l.]: Wiley-blackwell, 2009. 419 p.
- Nieuwenhuize J, Maas YEM, Middelburg JJ. Rapid analysis of organic carbon and nitrogen in particulate materials. *Mar Chem* 1994; 45:217-24.
- Nisbet EG and Fowler CMR. Archaeal metabolic evolution of microbial mats. *Proc R Soc Lond B*, 1999; 266:2375-82.
- Nobel WT, Matthijs HCP, Elert EV and Mur LR. Comparison Of the light-limited growth of the nitrogen-fixing Cyanobacteria *Anabaena* and *Aphanizomenon*. *New Phytol* 1998; 138:579-87.
- Noffke N & Krumbein WE. A quantitative approach to sedimentary surface structures contoured by the interplay of microbial colonization and physical dynamics. *Sedimentology*, 1999; 46:417-26.
- Noffke N and Paterson D. An actualistic perspective: biotic-physical interaction of benthic microorganisms and the significance for the biological evolution of Earth. *Geobiology* 2008; 6:1–93.
- Noffke N, Knoll AH and Grotzinger JP. Sedimentary Controls on the Formation and Preservation of Microbial Mats in Siliciclastic Deposits: A Case Study from the Upper Neoproterozoic Nama Group, Namibia. *Palaios* 2002; 17: 533–44.
- Noffke N. *Geobiology: Microbial Mats in Sandy Deposits from the Archean Era to Today*. 1st Edition. Springer, 2010.

- Noffke N., Gerdes G., Klenke T. and Krumbein WE. "Microbially Induced Sedimentary Structures—A New Category within the Classification of Primary Sedimentary Structures," *J Sediment Res* 2001; 71(5):649-56.
- Nold SC and Ward DM. Photosynthate Partitioning and Fermentation in Hot Spring Microbial Mat Communities. *Appl Environ Microbiol*, 1996; 62(12):4598-607.
- Paerl HW and Yannarell AC. Environmental Dynamics, Community Structure and Function in a Hypersaline Microbial Mat In: Seckbach J and Oren A (eds.) *Microbial Mats: Modern and Ancient Microorganisms in Stratified Systems*. Springer + Business Media B. V, 2010
- Paerl HW, Pinckney JL and Stegge TF. Cyanobacterial±bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environ Microbiol*, 2000; 2(1):11-26.
- Paerl HW, Fitzpatrick M and Bebout BM. Seasonal nitrogen fixation dynamics in a marine microbial mat: Potential roles of cyanobacteria and microheterotrophs. *Limnol Oceanogr*, 1996; 41(3):419-27.
- Pan J, Bournod CN, Cuadrado DG, Vitale A, Piccolo MC. Interaction between Estuarine Microphytobenthos and Physical Forcings: The Role of Atmospheric and Sedimentary Factors. *Int J Geosc* 2013a; 4:352-61.
- Pan J, Bournod CN, Pizani NV, Cuadrado DG & Carmona NB. Characterization of Microbial Mats from a Siliciclastic Tidal Flat (Bahía Blanca Estuary, Argentina). *Geomicrobiol J* 2013b; 30:665–674.
- Percopo I, Siano R, Cerino F, Sarno D & Zingone A. Phytoplankton diversity during the spring bloom in the northwestern Mediterranean Sea. *Bot Mar* 2011; 54(3): 243-67.

- Peterson RB and Burris RH. Properties of Heterocysts Isolated with Colloidal Silica. Arch Microbiol, 1976; 108:35-40.
- Pinckney J and Zingmark RG. Photophysiological responses of intermareal benthic microalgal communities to in situ light environments: Methodological considerations. Limnol Oceanogr 1993; 38(7):1373-83.
- Pinckney J, Paerl HW and Bebout BM. Salinity control of benthic microbial mat community production in a Bahamian hypersaline lagoon. J Exp Mar Biol Ecol 1995a; 187:223-37.
- Pinckney J, Paerl HW and Fitzpatrick M. Impacts of seasonality and nutrients in microbial mat community structure and function. Mar Ecol Prog Ser 1995b; 123:207-16.
- Pinckney JL, Carman KR, Lumsden SE e Hymel SN. Microalgal-meiofaunal trophic relationships in muddy intertidal estuarine sediments. Aquat Microb Ecol 2003; 31: 99–108.
- Polerecky L, Bachar A, Schoon R, Grinstein M, Jørgensen BB, de Beer D and Jonkers HM. Contribution of *Chloroflexus* respiration to oxygen cycling in a hypersaline microbial mat from Lake Chiprana, Spain. Environ Microbiol, 2007; 9(8):2007-24.
- PottsM. Desiccation tolerance of prokaryotes. Microbiol Mol Biol Rev, 1994; 58(4):755-805.
- Prescott GW, Croasdale HT, Vinyard WC, 1975. A synopsis of North American desmids. II. Desmidiaceae: Placodermae. University of Nebraska Press, Lincoln: 275 pp.
- Prieur D. Microbiology of deep-sea hydrothermal vents. Trend Biotechnol, 1997; 15(7):242-244.

- Prisco JC, Fritsen CH, Adams EE, Giovannoni SJ, Paerl HW, McKay CPP, Doran PT, Gordon DA, Lanoil BD and Pinckney JL. Perennial Antarctic Lake Ice: An Oasis for Life in a Polar Desert. *Science*, 1998; 280:2095-2098.
- Quesada A and Vincent WF. Strategies of adaptation by Antarctic cyanobacteria to ultraviolet radiation. *Eur J Phycol*, 1997; 32:335-42.
- Ramsing N, Gundersen J. Seawater and gasses: tabulated physical parameters of interest to people working with microsensors in marine systems. Unisense, 2013. Available:
<http://www.unisense.com/files/PDF/Diverse/Seawater%20&%20Gases%20table.pdf>
- Reed RH, Borowitzka LJ, Mackay MA, Chudek JA, Foster R, Warr SRC, Moore DJ and Stewart WDP. Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria, *FEMS Microbiol Rev*, 1986; 39:51-6.
- Reed RH, Chudek JA, Foster R & Stewart WDP. Osmotic adjustment in cyanobacteria from hypersaline environments. *Arch Microbiol*, 1984; 138:333-7.
- Reis VM, Teixeira KRS. Fixação biológica de nitrogênio - estado da arte. In: Aquino AM, Assis RL, editores. *Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável*. Brasília, DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; 2005. p.151-80.
- Rhe G and Lederman TC. Effects of Nitrogen sources on P-limited Growth of *Anabaena flos-aquae*. *J Phycol* 1983; 19: 179-85.
- Riding R. Microbial Carbonates: The Geological Record of Calcified Bacterial-Algal Mats and Biofilms. *Sedimentology* 2000; 47(1):179-214.

- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M & Stanier RY. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *J Gen Microbiol*, 1979; 111:1-61.
- Rippka R. Isolation and Purification of Cyanobacteria. *Method Enzymol* 1988; 167:3-27.
- Ritchie RJ. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth Res* 2006; 89:27–41.
- Roeselers G, Norris TB, Castenholz RW, Rysgaard S, Glud RN, Kühl M and Muyzer G. Diversity of phototrophic bacteria in microbial mats from Arctic hot springs (Greenland). *Environ Microbiol*, 2007; 9(1):26-38.
- Rothschild LJ and Mancinelli RL. Life in Extreme Environments. *Nature*, 2001; 409:1092-101.
- Round, F.E., Crawford, R.M., & Mann, D.G. 1990. The Diatoms: Biology and morphology of the genera. Cambridge University Press, Cambridge. 747 p.
- Sahan E, Sabbe K, Creach V, Hernandez-Raquet G, Vyverman W, Stal LJ, Muyzer G. Community structure and seasonal dynamics of diatom biofilms and associated grazers in intermareal mudflats. *Aquat Microb Ecol*, 2007; 47:253-66.
- Salmaso N and Padisák J. Morpho-functional groups and phytoplankton development in two deep lakes (Lake Garda, Italy and Lake Stechlin, Germany). *Hydrobiologia* 2007; 578:97-112.
- Scherer S and Böger P. Respiration of blue-green algae in the light. *Arch Microbiol* 1982; 132:329–32
- Schieber J, Bose PK, Eriksson PG, Banerjee S, Sarkar S, Altermann W, Catuneanu O. Atlas of Microbial Mat Features Preserved Within The Siliclastic Rock Record. Amsterdam: Elsevier Science, 2007.

- Schirmer BE, Antonelli A and Bagheri HC. The origin of multicellularity in cyanobacteria. *BMC Evolutionary Biology*, 2011. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/11/45>.
- Schopf JW, Kudryavtsev AB, Czaja AD, Tripathi AB. Evidence of Archean life: Stromatolites and microfossils. *Precambrian Res*, 2007; 158:141–155.
- Severin I & Stal LJ. Light dependency of nitrogen fixation in a coastal cyanobacterial mat. *ISME*, 2008; 2:1077-88.
- Severin I and Stal LJ. NifH expression by five groups of phototrophs compared with nitrogenase activity in coastal microbial mats. *FEMS Microbiol Ecol* 2010; 73:55–67.
- Severin I, Acinas, SG & Stal LJ. Diversity of nitrogen-fixing bacteria in cyanobacterial mats. *FEMS Microbiol Ecol* 2010; 73:514–525.
- Severin I, Confurius-Guns, V and Stal LJ. Effect of salinity on nitrogenase activity and composition of the active diazotrophic community in intermareal microbial mats. *Arch Microbiol* 2012; DOI 10.1007/s00203-011-0787-5.
- Shafik HM, Vörös L, Spröber P, Presing M and Kovacs AW. Some special morphological features of *Cylindrospermopsis raciborskii* in batch and continuous cultures. *Hydrobiologia* 2003; 506–509:163–7.
- Shahak Y and Hauska G. Sulfide Oxidation from Cyanobacteria to Humans: Sulfide–Quinone Oxidoreductase (SQR). In: Hell R. et al. (eds.) *Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms*. Springer, 2008.
- Silva LHS, Senra MCE, Farulo TCLM, Carvalhal SBV, Alves SAPMN, Damazio CM, Shimizu VTA, Santos RC and Iespa AAC. Composição Paleobiológica E Tipos Morfológicos Das Construções Estromatolíticas Da Lagoa Vermelha, Rj, Brasil. *Rev Bras Paleontol*, 2004; 7(2):193-8.

- Silva LHS, Damazio CM, Iespa AAC. Registro de biolaminóides poligonais na lagoa de Araruama, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Geol*, 2005; 18(2):153-8.
- Silva LHS, Damazio-Iespa CM and Iespa AAC. Estudo Sedimentológico e Geomicrobiológico das Esteiras Microbianas Tipo Filme da Lagoa Pitanguinha, Região dos Lagos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Anu Inst Geociênc*, 2007; 30(1):67-72.
- Silva LHS, Delfino DO, Lopes FAS, Iespa AAC, Damazio CM. Esteiras microbianas poligonais do brejo do Espinho, RJ. *Rev Geol*, 2006; 19(2):155-61.
- Simonsen, R. 1974. The diatom plankton of the Indian Ocean Expedition of R/V Meteor 1964-1965. "Meteor" Forsch.-Ergebnisse Reihe D, 19:1-107.
- Solé A, Gaju N, Méndez-Álvarez S and Esteve I. Confocal laser scanning microscopy as a tool to determine cyanobacteria biomass in microbial mats. *J Microsc*, 2001; 204(3):258-62.
- Spröber P, Shafik HM, Presing M, Kovacs AW & Herodek S. Nitrogen uptake and fixation in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* under different nitrogen conditions. *Hydrobiologia*, 2003; 506–509: 169–174.
- Staal M, Hekkert SL, Brummer GJ, Veldhuis M, Sikkens C, Persijn S and Stal LJ. Nitrogen fixation along a north–south transect in the eastern Atlantic Ocean. *Limnol Oceanogr*, 2007; 52(4):1035-16.
- Staal M, Hekkert SL, Harren FJM and Stal LJ. Effects of O₂ on N₂ fixation in heterocystous cyanobacteria from the Baltic Sea. *Aquat Microb Ecol*, 2003^b; 33:261-70.
- Staal M, Lintel-Hekkert S, Harren F and Stal LJ. Nitrogenase Activity in cyanobacterial measured by the acetylene reduction assay: a comparison between batch incubation and on-line monitoring. *Environ Microbiol* 2001; 3(5): 343-51.

- Staal M, Meysman FJR and Stal LJ. Temperature excludes N₂-fixing heterocystous cyanobacteria in the tropical oceans. *Nature*, 2003^a; 425:504-7.
- Stal LJ and Moezelaar R. Fermentation in Cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 1997; 21/179-211.
- Stal LJ, van Gemerden H and Krumbein WE. Structure and Development of a Benthic Marine Microbial Mat. *FEMS Microbiol Ecol* 1985; 31:111-25.
- Stal LJ. Is the distribution of nitrogen-fixing cyanobacteria in the oceans related to temperature? *Environ Microbiol* 2009; 11(7)/1632-45.
- Stal LJ. Microphytobenthos as a biogeomorphological force in intermareal sediment stabilization. *Ecol Eng* 2010; 36:236-45.
- Stal LJ. Nitrogen Fixation in Cyanobacterial Mats. *Method Enzymol*, 1988; 167: 474-484.
- Stal LJ. Tansley Physiological Ecology of Cyanobacteria in Microbial Mats and Other Communities. *New Phytol* 1995, 131:1-32.
- Steppe TF and Paerls HW. Potential N₂ fixation by sulphate-reducing bacteria in a marine intermareal microbial mat. *Aquat Microb Ecol*, 2002; 28:1-12.
- Steppe TF, Pinckney JL, Dyble J and Paerl HW. Diazotrophy in Modern Marine Bahamian Stromatolites. *Microb Ecol*, 2001; 41:36-44.
- Stock MS and Ward AK. Blue-green Algal Mats in a Small Stream. *J Phycol* 1991; 27:692-8.
- Stolz JF. Bacterial Intracellular Membranes. In: *Encyclopedia Of Life Sciences*. John Wiley & Sons, 2007.
- Stolz JF. Structure of Microbial Mats and Biofilms. In: Riding RE and Awramik SM (Eds.) *Microbial Sediments*. Verlag Berlin Heidelberg , Springer, 2000.

- Stoodley P, Sauer K, Davies DG and Costerton JW. Biofilms As Complex Differentiated Communities. *Annu Rev Microbiol*, 2002; 56:187–209.
- Suguio K. *Introdução à sedimentologia*. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 1973.
- Sundbäck K, Carlson L, Nilsson C, Jonsson B, Wulff A, Odmark S. Response of benthic microbial mats to drifting green algal mats. *Aquat Microb Ecol*, 1996^a; 10:195-208.
- Sundbäck K, Nilsson C, Odmark S and Wulff A. Does ambient UV-B radiation influence marine diatom-dominated microbial mats? A case study. *Aquat Microb Ecol*, 1996; 11:151-9.
- Sundbäck K, Odmark S, Wulff A, Nilsson C, Wängberg SA. Effects of enhanced UVB radiation on a marine benthic diatom mat. *Mar Biol*, 1997; 128:171-9.
- Talgatti DM. *Diatomáceas (Bacillariophyta) em zonas úmidas da costa sul do Brasil: estudo da comunidade bentônica*. Tese de Doutorado, UFRGS, Porto Alegre. 112 p.
- Taton A, Grubisic S, Brambilla E, De Wit R and Wilmotte A. Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a Morphological and Molecular Approach. *Appl Environ Microbiol*, 2003; 69(9):5157-69.
- Thompson RC, Norton TA and Hawkins SJ. Physical Stress And Biological Control Regulate The Producer–Consumer Balance In Intermareal Biofilms. *Ecology* 2004; 85(5):1372–82.
- Thornton DCO, Dong LF, Underwood GJC & Nedwell DB. Factors affecting microphytobenthic biomass, species composition and production in the Colne Estuary (UK). *Aquat Microb Ecol* 2002; 27:285-300.

- Tomazelli LJ. O regime de ventos e a taxa de migração de das dunas eólicas costeiras do Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisas* 1993; 20:18–26.
- Turpin DH, Layzell DB and Elrifi IR. Modeling the C economy of *Anabaena flos-aquae*. Estimates of establishment, maintenance, and active costs associated with growth on NH₃, NO₃⁻ and N₂. *Plant Physiol* 1985; 78:746–52
- Underwood G and Provot L. Determining the environmental preferences of four estuarine epipellic diatom taxa: growth across a range of salinity, nitrate and ammonium conditions. *Eur J Phycol* 2000; 35:173-82.
- Underwood GJC, Nilsson C, Sundbäck K and Wulff A. Short-Term Effects Of Uvb Radiation on Chlorophyll Fluorescence, Biomass, Pigments, and Carbohydrate Fractions in a Benthic Diatom Mat. *J Phycol*, 1999; 35:656-66.
- Underwood GJC, Phillips J and Saunders K. Distribution of estuarine benthic diatom species along salinity and nutrient gradients. *Eur J Phycol* 1998; 33:173-83.
- Underwood GJC. Exopolymers (Extracellular Polymeric Substances) in Diatom-dominated Marine Sediment Biofilms. In: Seckbach, J. & Oren, A. *Microbial Mats: Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Dordrecht: Springer, 2010, 289-302.
- Underwood GJC. Seasonal and spatial variation in Epipellic diatom assemblages in the Severn estuary. *Diatom Res* 1994; 9(2):451-72.
- Valentine K, Mariotti G & Fagherazzi S. Repeated erosion of cohesive sediments with biofilms. *Adv Geosci* 2014; 39:9–14.
- Van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

- Vázquez G. The Role of Algal Mats on Community Succession in Dunes and Dune Slacks. In: Martínez ML and Psuty NP (eds.) *Ecological Studies: Coastal Dunes, Ecology and Conservation*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004.
- Vinocur A and Pizarro H. Microbial mats of twenty-six lakes from Potter Peninsula, King George Island, Antarctica. *Hydrobiologia*, 2000; 437:171-85.
- Wachendörfer V, Krumbein WE and Schellnhuber HJ. Bacteriogenic porosity of marine sediments – a case of biomorphogenesis of sedimentary rocks, In: Krumbein WE, Paterson DM and Stal LJ (eds.) *Biostabilization of Sediments*. Bibliotheks-Informationssystem BIS, Oldenburg, 1994.
- Walsby AE. Cyanobacterial heterocysts: terminal pores proposed as sites of gas exchange. *TRENDS Microbiol* 2007; 15(8). DOI:10.1016/j.tim.2007.06.007
- Walsby AE. The permeability of heterocysts to the gases nitrogen and oxygen. *Proc R Soc Lond B* 1985; 226:345–66.
- Ward DM, Ferris MJ, Nold SC and Bateson MM. A Natural View of Microbial Biodiversity within Hot Spring Cyanobacterial Mat Communities. *Microbiol Mol Biol R*, 1998. 62(4):1353-70.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA & Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 1991; 173:697–703.
- Wetzel RG. Microcommunities and Microgradients: Linking Nutrient Regeneration, Microbial Mutualism, And High Sustained Aquatic Primary Production. *Neth J Agric Sci*, 1993; 27(1):3-9.
- Wieland A and Kühl M. Regulation of photosynthesis and oxygen consumption in a hypersaline cyanobacterial mat (Camargue, France) by irradiance, temperature and salinity. *FEMS*, 2006; 55:195-210.

- Woelfel J, Schumann R, Adler S, Hübener T, Karsten U. Diatoms inhabiting a wind flat of the Baltic Sea: Species diversity and seasonal succession. *Estuar Coast Shelf S* 2007; 75:296-307.
- Wolk CP, Ernst A and Elhai J. Heterocyst Metabolism and Development. In: D. A. Bryant (ed): *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2004. pp. 769–823.
- Yallop ML, Paterson DM and Wellsbury P. Interrelationships between Rates of Microbial Production, Exopolymer Production, Microbial Biomass, and Sediment Stability in Biofilms of Intermareal Sediments. *Microb Ecol* 2000; 39:116-27. DOI: 10.1007/s002489900186
- Zehr JP & McReynolds LA. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55:2522–26.
- Zehr JP, Mellon M, Braun S, Litaker W, Steppe T and Paerl HW. Diversity of Heterotrophic Nitrogen Fixation Genes in a Marine Cyanobacterial Mat. *Appl Environ Microbiol*, 1995; 61(7):2527-32.
- Zierenberg RA, Adams MWW and Arp AJ. Life in extreme environments: Hydrothermal vents. *PNAS*, 2000; 97(24):12961-2.