

Dissertação de mestrado

Variação temporal da atividade enzimática associada aos microrganismos presentes no rizosedimento da *Spartina maritima* e *Spartina versicolor*

Mestrando: João Matias Rato

Orientação: Professora Doutora Maria Helena Soares Martins Adão

Coorientação: Professora Doutora Maria Isabel Violante Caçador

Introdução

- Localização e caracterização do sapal;
- Tipo de vegetação dominante;
- Importância dos sapais:
 - Viveiro para os peixes;
 - Reprodução e alimentação para as aves;
 - Serviços dos ecossistemas.
- Composição e libertação de exsudados:
- Exsudados e composição.



Figura 1 - Sapal de Alcochete

Tópicos

Descrição
do projeto

Metodologia
do projeto

Resultados
chave

Detalhes da
pesquisa

Conclusões

Descrição do Projeto

Hipótese de trabalho

Atividade enzimática é diferente no rizosedimento de *Spartina maritima* e *Spartina versicolor*

Objetivos

- Análise de atividade enzimática extracelular dos microrganismos do rizosedimento:
- Medição os parâmetros abióticos.

Resultados

- Atividade enzimática;
- Variáveis ambientais;
- Teste Kruskal-Wallis;
- PCO;
- PERMANOVA;
- SIMPER.

Metodologia - Amostragem

- Recolha dos *cores* de rizosedimento de *Spartina maritima* e *Spartina versicolor*
- 4 períodos temporais: Novembro 2012, Fevereiro 2013, Maio 2013 e Fevereiro 2014
- Local de estudo: Estuário do Tejo, Alcochete



Figura 2 - *S. maritima*



Figura 3 - *S. versicolor*

Metodologia - Tratamento das amostras

- Foram sujeitas a uma série de testes dividindo-se em 2 grupos:
 1. Atividade enzimática:
 - i. Fenol oxidase;
 - ii. Peroxidase;
 - iii. β -glucosidase;
 - iv. Fosfatase ácida;
 - v. Fosfatase alcalina;
 - vi. β -N-acetilglucosaminidase;
 - vii. Sulfatase;
 - viii. Protease;
 - ix. Urease;
 - x. Desidrogenase.
 2. Variáveis ambientais:
 - i. Humidade relativa;
 - ii. Matéria orgânica;
 - iii. pH;
 - iv. Salinidade.

Metodologia - Atividade enzimática



Enzima	Substrato
Fenol oxidase	L-DOPA
Peroxidase	L-DOPA + peróxido de hidrogénio
β -glucosidase	p-nitrofenil- β -D-glucopiranosose
Fosfatase ácida	p-nitrofenil-fosfato
Fosfatase alcalina	p-nitrofenil-fosfato
β -N-acetilglucosaminidase	p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamina
Sulfatase	p-nitrofenil-sulfatase
Protease	Caseína
Urease	Ureia
Desidrogenase	TTC

Tabela 1 - Enzimas e respetivo substrato

Metodologia - Atividade enzimática

Leitura da
absorvância



Reta de
calibração
do substrato



Análise
quantitativa
da atividade

Medição da absorvância no
equipamento TECAN
Absorbance Microplate
Reader

Metodologia - Variáveis ambientais

Humidade relativa

- Secagem do sedimento;
- Unidade: percentagem.

Matéria orgânica

- Determinação pela perda na ignição;
- Queima do sedimento a 600 °C;
- Unidade: percentagem.

pH

- Secagem do sedimento > adição de água ultra-pura > agitação > centrifugação;
- Medição do pH no sobrenadante através de um potenciómetro;
- Unidade: adimensional.

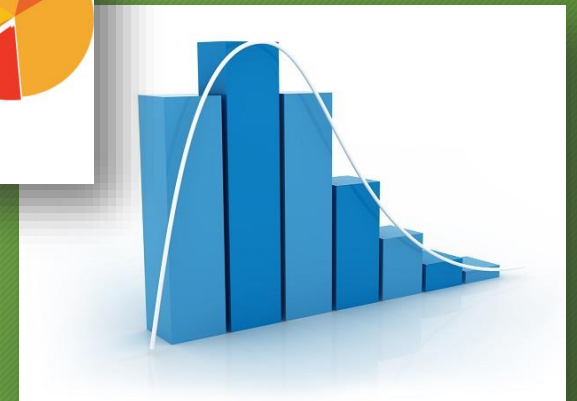
Salinidade

- Secagem do sedimento > adição de água ultra-pura > agitação > centrifugação;
- Medição no refratómetro;
- Unidade: PSU.

Tabela 2 - Procedimento para obtenção dos dados das variáveis ambientais

Metodologia - Análise estatística

- I. Kruskal-Wallis (*software Statistica*);
- II. PCO (PRIMER 6)
- III. PERMANOVA (PRIMER 6)
- IV. SIMPER (PRIMER 6)



I. Média e análise de variância

Vantagens e desvantagens



- Rápido;

- Simples;

- Diferenças significativas.

- Pouco:

 - Informativo;
 - Preciso

- Demasiado geral.

Observações dos dados

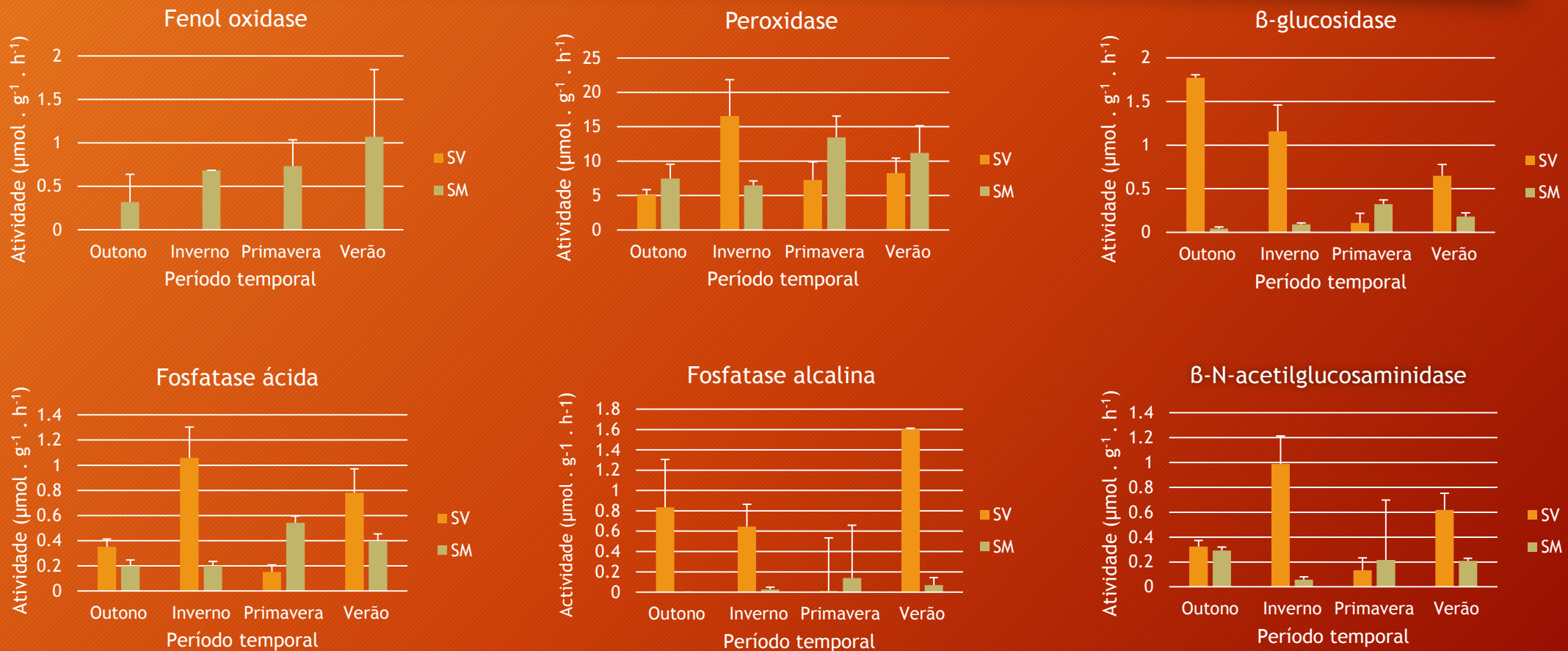


Figura 4 - Média e respetivo erro padrão das atividades enzimáticas no rizosedimento de *S. maritima* e *S. versicolor*, por período temporal

Observação dos dados

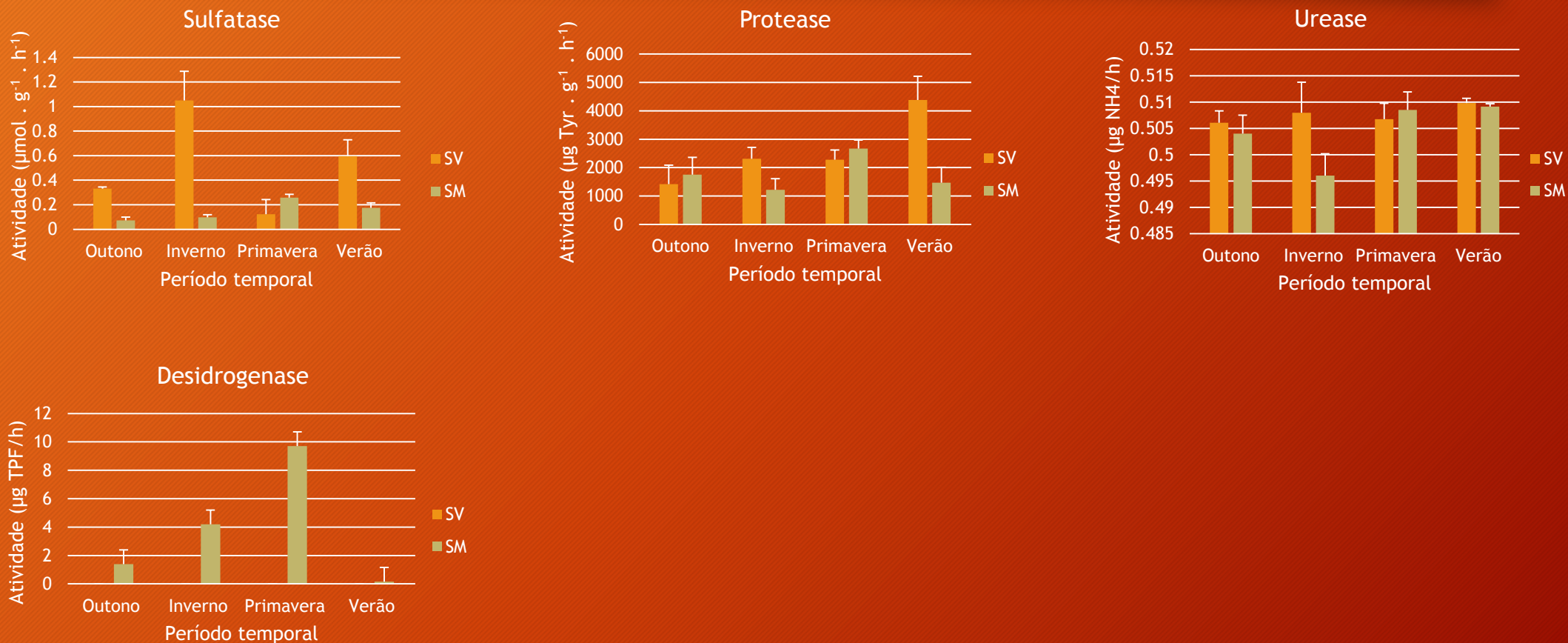


Figura 5 - Média e respetivo erro padrão das atividades enzimáticas no rizosedimento de *S. maritima* e *S. versicolor*, por período temporal

Observação dos dados - Kruskal-Wallis

- Foram colocadas duas hipóteses:
 - i. Existem diferenças significativas entre os rizosedimento de *S. maritima* e *S. versicolor* para cada uma das variáveis;
 - ii. Em cada espécie e para cada variável existem diferenças significativas entre períodos de amostragem

Observação dos dados - Kruskal-Wallis

Variável	Kruskal-Wallis (p)
FOX	0.006830
β-glucosidase	0.004703
Fosfatase alcalina	0.008694
Quitobiase	0.000877
Sulfatase	0.002449
Desidrogenase	0.000001
Humidade	0.000004
LOI	0.000152
pH	0.019292
Salinidade	0.000000

Hipótese 1 - Existem diferenças significativas entre os rizosedimento de *S. maritima* e *S. versicolor* para cada uma das variáveis

Tabela 3 - Resultado do teste de Kruskal-Wallis, apenas atividades enzimáticas cujas atividades foram diferentes ($p < 0.05$)

Observação dos dados - Kruskal-Wallis

Variável	<i>S. maritima</i> Kruskal-Wallis (p)	Resultado	<i>S. versicolor</i> Kruskal-Wallis (p)	Resultado
β-glucosidase	0.003744	O-P	0.011602	I-P
Fosfatase ácida	0.023379	O-P	0.016557	I-P
	0.019701	I-P	---	---
Quitobiase	0.048886	I-P	0.011602	I-P
Sulfatase	0.023379	O-P	0.011602	I-P
Desidrogenase	0.027671	O-P	---	---
	0.045158	O-V	---	---
LOI	---	---	0.045158	P-V
pH	0.001355	I-V	0.035454	O-I
	---	---	0.010598	O-P
Salinidade	0.001669	O-P	---	---

Hipótese 2 - Em cada espécie e para cada variável existem diferenças significativas entre períodos de amostragem

Tabela 4 - Resultado do teste de Kruskal-Wallis, apenas períodos temporais responsáveis pelas diferenças ($p < 0.05$)

Conclusões


- Fenol oxidase, β -glucosidase, fosfatase alcalina, quitobiase, sulfatase e desidrogenase apresentam diferenças;
- Diferenças entre as 4 datas.


Diferenças significativas entre os rizosedimentos das espécies?



II. Principal Coordinates Analysis

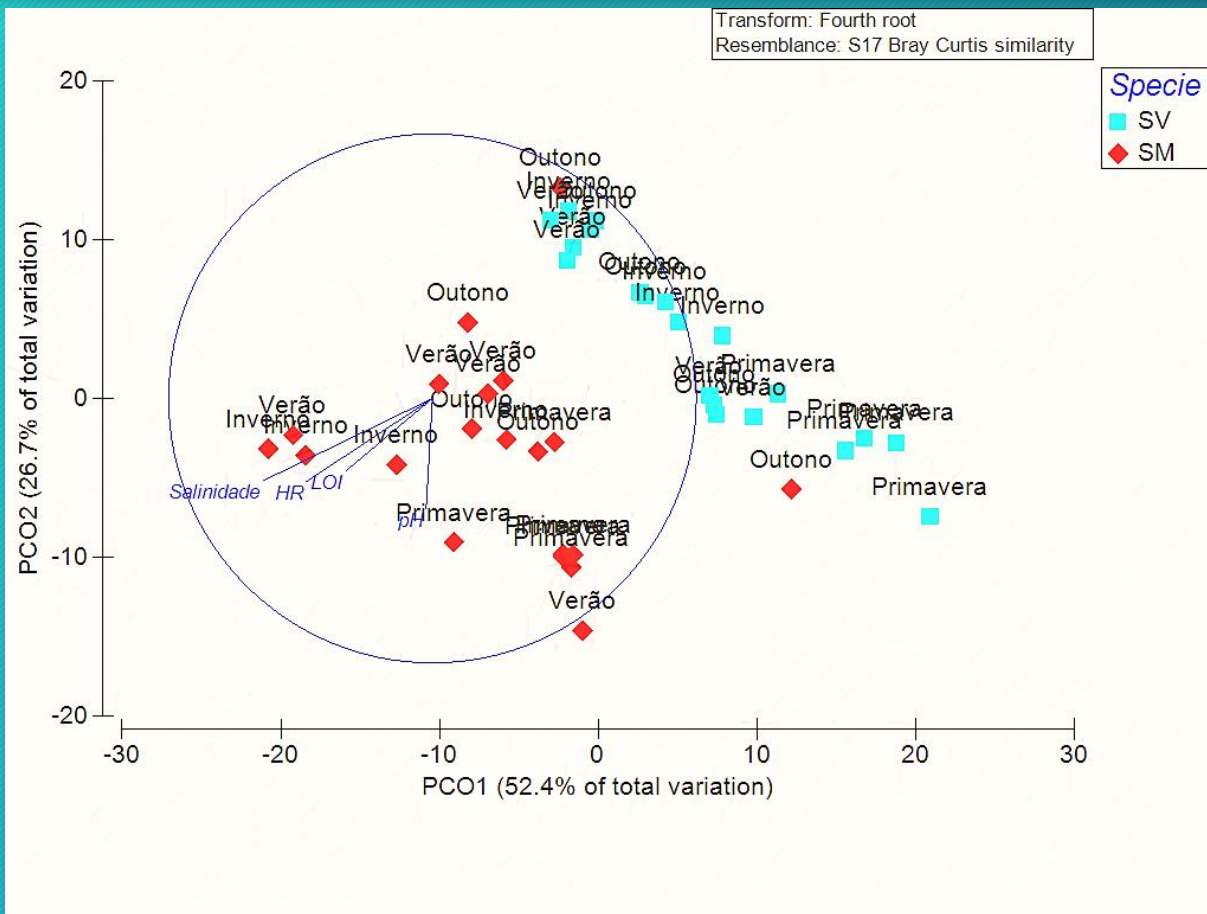
Vantagens e desvantagens

- 
- Objetivo;
 - Simples;
 - Robusto.



- Não identifica as diferenças em valor das fontes de variação.

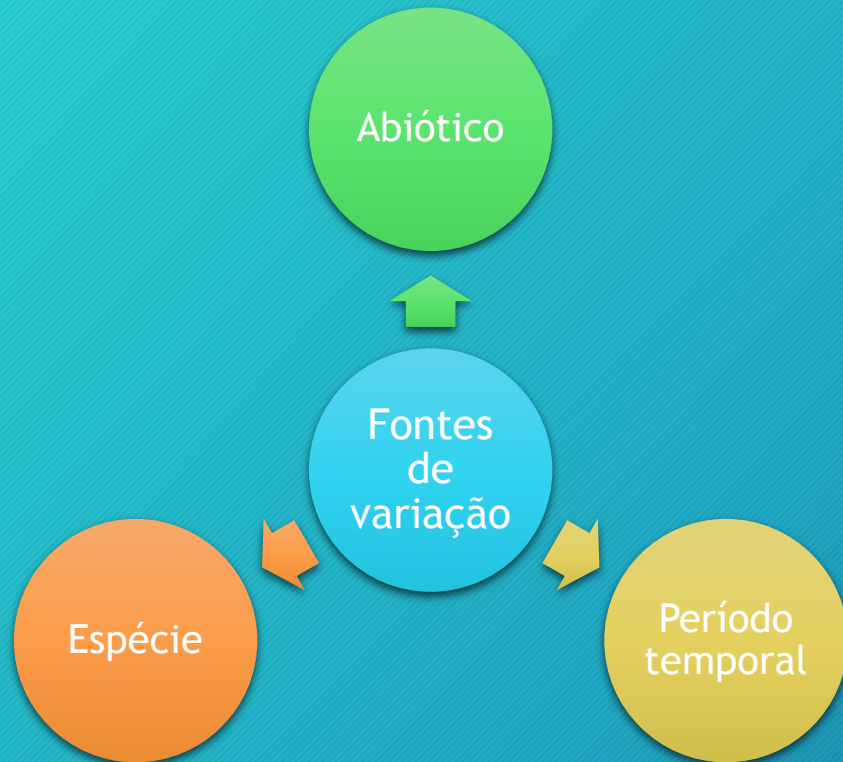
Observação dos Resultados



Diferenças
significativa entre
os rizosedimentos
das espécies?

Figura 6 - Resultado do PCO

Resultados

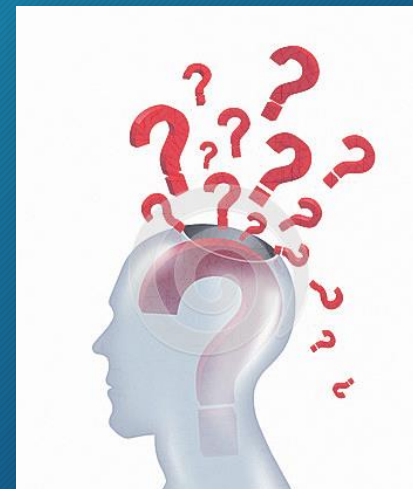


Fontes de variação responsáveis pela separação das atividades enzimáticas por espécie no respectivo rizosedimentos

Conclusões

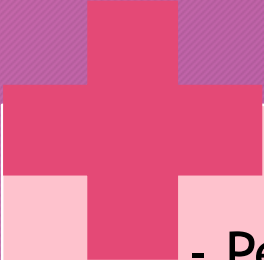
- Espécies formam 2 grupos distintos;
- *Spartina maritima* é muito influenciada pelos fatores abióticos;
- *Spartina versicolor* não sofre tanta influência.

Como é a variação temporal?



III. PERMANOVA

Vantagens e desvantagens

- 
- Permite testar as interações entre os fatores
 - Modelo experimental;
 - Robusto;
 - Flexível ;
 - Não pressupõe normalidade.

- Não especifica se diferenças são devido à dissimilaridade entre grupos ou dentro dos grupos.

Delimitamento

- Dois fatores:
 - Período temporal (fixo e ortogonal), com 4 níveis
 - Espécie (fixo e ortogonal), com 2 níveis.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Pseudo-F	Permutações únicas	P (perm)
Espécie	1	2281,8	2281,8	30,227	999	0,001
Período temporal	3	1455,7	485,24	6,4281	999	0,001
Espécie x Período temporal	3	1040,5	346,82	4,5945	997	0,001
Resíduo	32	2415,6	75,487			
Total	39	7193,5				

Tabela 5 - Delimitamento experimental para realização do teste PERMANOVA

Resultados



Como é a variação temporal?

Conclusões

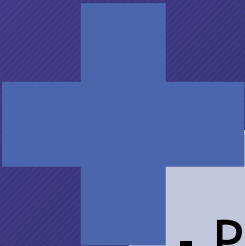

- Atividade enzimática no rizosedimento não é a mesma em todos os períodos de amostragem;
- Nos 4 períodos de amostragem verificou-se diferenças.

Como varia a atividade enzimática nos rizosedimentos em cada período de amostragem?

Quais as enzimas responsáveis pela diferença entre rizosedimentos?

IV. SIMPER

Vantagens e desvantagens

- 
- 
- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">- Preciso;- Indica:<ul style="list-style-type: none">Abundância;Contribuição.- Completo. | <ul style="list-style-type: none">- Complexo. |
|---|---|

Similaridade

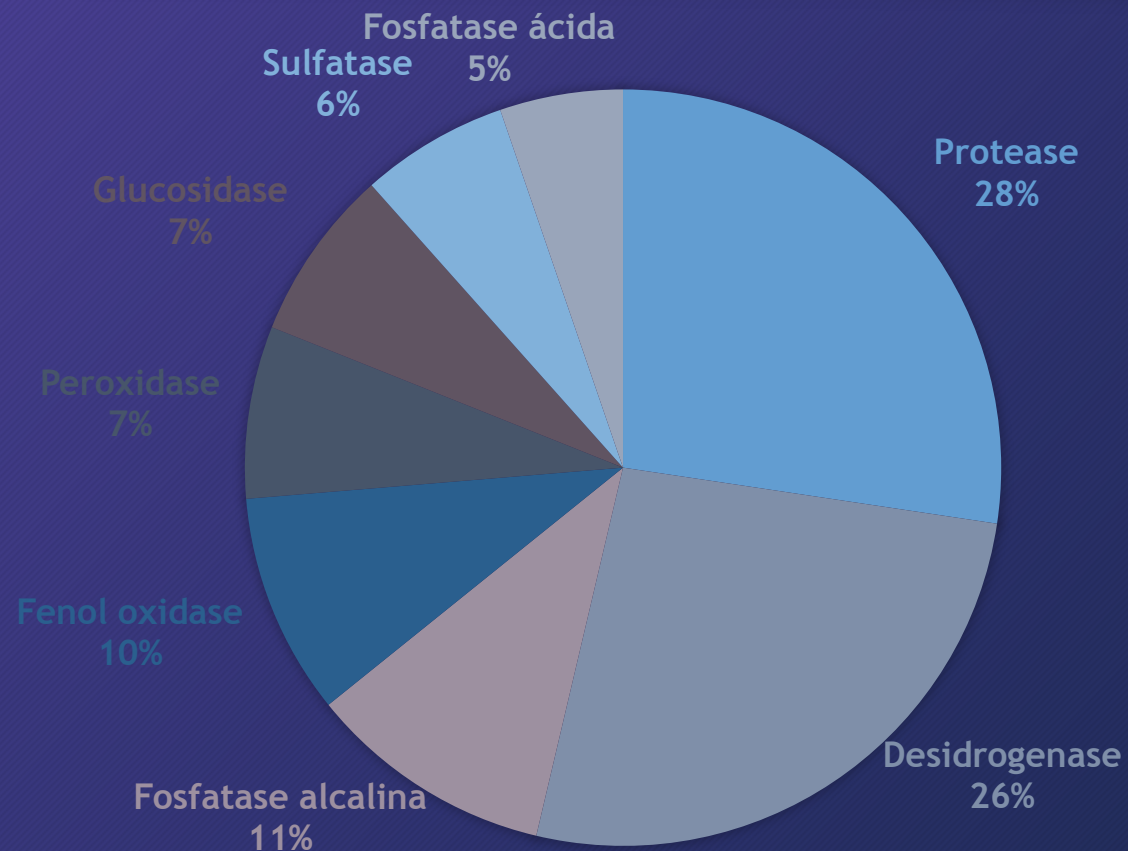
Maior similaridade



Menor similaridade

Similaridade entre o rizosedimento de *S. maritima* e *S. versicolor*, por período de amostragem

Dissimilaridade entre espécies



Quais as enzimas responsáveis pela diferença entre sedimentos e o seu peso?

Figura 7 - Contribuição de cada enzima para a dissimilaridade entre *S. maritima* e *S. versicolor*

Conclusão

- Outono e Verão = menor variação;
- Primavera e o Inverno = maior variação;
- Atividades das enzimas protease e desidrogenase são as que contribuem mais para a diferença entre os rizosedimentos de *S. versicolor* e *S. maritima*.

Resumo do Projeto

Conclusões

- As atividades enzimáticas são diferentes no rizosedimento de *Spartina maritima* e *Spartina versicolor*;
- Identificação indireta de variações nas comunidades de microrganismos;
- Existe relação entre a espécie vegetal, os seus exsudados e as comunidades de microrganismos;
- Existe correlação entre fatores abióticos e as atividades enzimáticas;
- Deve considerar-se a temperatura em trabalhos futuros.

Agradecimentos

- Aos meus pais pelo apoio que sempre deram e pelo auxílio;
- Às minhas orientadoras Professora Doutora Helena Adão e Professora Doutora Isabel Caçador;
- Aos elementos da equipa do MARE pela formação e auxílio, nomeadamente Bernardo, João e Erica.



Bibliografia

- Burgmann, H.; Meier, S., Bunge; M., Widmer, F. & Zeyer, J. (2005). Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environmental Microbiology* 7: 1711-1724
- Costanza, R.; d'Arge, R.; de Groot, R.; Farber, S.; Grasso, M.; Hannon, B.; Limburg, K.; Naeem, S.; O'Neill, R. V.; Paruelo, J.; Raskin, R. G.; Sutton, P. & van den Belt, M. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387: 253-260
- Duineveld, B. M.; Rosado, A. S.; van Elsas, J. D. & van Veen. J. A. (1998). Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. *Applied and Environmental Microbiology*: 4950-4957
- Gomes, N. C. M.; Heuer, H.; Schonfeld, J.; Costa, R.; Mendonça-Hagler, L. & Smalla, K. (2001). Bacterial diversity of the rizosphere of maize (*Zea Mays*) grown in tropical soil studied by temperature gel electrophoresis. *Plant and Soil*. 232: 167-180
- Grayston, S. J.; Wang, S.; Campbell, C. D. & Edwards, A. C. (1998). Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 3: 369-378
- Hines, M. E.; Evans, R. S.; Sharak - Genthner, B. R., Willis, S. G.; Fiedman, S.; Rooney-varga, J. N. & Devereaux, R. (1999). Molecular phylogenetic and biochemical studies of sulphate - reducing bacteria in the rizosphere of *Spartina alterniflora*. *Applied environmental Microbiology*. 465: 2209-2216
- Kowalchuk, G. A.; Buma, D. S.; de Boer, W.; Klinkhamer, P. G. L. & van Veen, J. A. (2002). Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 509-520
- Yang, C. H. & Crowley, D. E. (2000). Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*: 345-351

Muito obrigado.