



UNIVERSIDADE
DE ÉVORA

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

Escola de Ciências e Tecnologia



INSTITUTO
SUPERIOR DE
AGRONOMIA

*Hinc
Patriam
Susine*

Universidade de Lisboa

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Instituto Superior de Agronomia

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

João André da Silva Matias Pereira Rato

Orientadores:

Professora Doutora Maria Helena Soares Martins
Adão

Professora Doutora Maria Isabel Violante Caçador

Mestrado em Gestão e Conservação de Recursos Naturais

Dissertação

Évora, 2014



UNIVERSIDADE
DE ÉVORA

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

Escola de Ciências e Tecnologia



INSTITUTO
SUPERIOR DE
AGRONOMIA

*Hinc
Patriam
Susinet*

Universidade de Lisboa

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Instituto Superior de Agronomia

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

João André da Silva Matias Pereira Rato

Orientadores:

Professora Doutora Maria Helena Soares Martins
Adão

Professora Doutora Maria Isabel Violante Caçador

Mestrado em Gestão e Conservação de Recursos Naturais

Dissertação

Évora, 2014

I Agradecimentos

A realização da presente dissertação não foi possível sem o apoio das orientadoras, família, amigos e colegas da instituição que me acolheu para estágio. Por essa razão este espaço será dedicado a essas pessoas.

Gostaria de deixar o meu agradecimento há minha coorientadora, Professora Doutora Isabel Caçador pelo acolhimento no Centro de Oceanografia, disponibilidade, apoios e por disponibilizar o laboratório para realização da componente experimental.

Gostaria de deixar o meu agradecimento há minha orientadora, Professora Doutora Maria Helena Adão pela oportunidade de desenvolver o tema da presente dissertação, disponibilidade e auxílio para a realização deste trabalho.

Deixo o meu profundo agradecimento aos meus pais pelo apoio que sempre prestaram durante a minha formação, com especial foco nas condições que proporcionaram durante o meu mestrado e por acreditarem sempre em mim.

Aos meus amigos e Carina J. C. que me apoiaram e tiveram sempre uma palavra a dizer, que me desafiaram e contribuíram para me tornar numa pessoa melhor durante esta etapa da minha vida.

Aos meus colegas do MARE pois contribuíram para o desenvolvimento das minhas competências profissionais durante o meu estágio.

II Resumo

Os sapais são ecossistemas dinâmicos e contribuem para a defesa da linha costeira e conservação da biodiversidade.

As plantas libertam exsudados na rizosfera que influenciam fortemente as comunidades de microrganismos e conseqüentemente a libertação de enzimas extracelulares. Estas enzimas estão envolvidas na decomposição de resíduos orgânicos e no ciclo de nutriente do solo sendo um indicador da atividade microbiana, nomeadamente da sua composição e abundância. Este estudo teve como principal objetivo a análise da atividade enzimática no rizosedimento de duas espécies de sapal, *S. maritima* e *S. versicolor* no estuário do Tejo durante 4 períodos temporais: Novembro 2012, Fevereiro 2013, Maio 2013 e Fevereiro 2014. Os resultados mostraram diferenças na atividade das enzimas fenol oxidase, β -glucosidase, fosfatase alcalina, quitobiase, sulfatase, desidrogenase ($p\text{-value} < 0,05$) entre espécies e entre períodos de amostragem. O pH, salinidade, matéria orgânica e humidade influenciam a atividade enzimática e os exsudados influenciam a atividade enzimática, tendo-se verificado uma separação das duas espécies.

Palavras-chave: atividade enzimática, enzimas extracelulares, estuário do Tejo, *Spartina maritima*, *Spartina versicolor*.

III Abstract

“Temporal variation of enzymatic activity associated with the microorganisms living in the *Spartina maritima* and *Spartina versicolor* rizosediment”

Saltmarshes are dynamic ecosystems and contribute to defence of the coastline and biodiversity conservation.

Plants release exudates that have a strong influence on the microorganisms communities present on the rhizosphere and consequently in the release of extracellular enzymes. These enzymes are involved in organic residues decomposition and nutrient cycle of the soil, being a good indicator of microbial activity, composition and abundance. The main goal of this study was the analysis of enzymatic activity of the rizosediment of two saltmarsh plant species, *S. maritima* and *S. versicolor* on Tagus estuary in four temporal periods: November 2012, February 2013, May 2013 and February 2014. The results show significant differences in phenol oxidase, β -glucosidase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, quitobiase, sulfatase, dehydrogenase, protease and urease enzymatic activity (p -value < 0.05) between species and between sampling periods. The environmental factors such pH, salinity, organic matter and humidity also influence the enzymatic activity and exudates leading to separation by specie.

Keywords: enzymatic activity, extracellular enzymes, *Spartina maritima*, *Spartina versicolor*, Tagus estuary.

Índice

I Agradecimentos.....	3
II Resumo	4
III Abstract.....	5
1 Introdução.....	8
1.1 Local em estudo e caracterização	8
1.2 Espécies em estudo	8
1.3 O solo, o ciclo de nutrientes e a sua dinâmica	9
1.4 A Rizosfera e a sua influência nas comunidades de microrganismos.....	10
1.5 Os microrganismos, as enzimas e a sua importância	11
2 Materiais e métodos.....	14
2.1 Descrição do local e amostragem	14
2.2 Características físico-químicas do sedimento.....	14
2.3 Determinação da atividade enzimática da desidrogenase	15
2.4 Determinação da atividade enzimática extracelular da urease.....	15
2.5 Determinação da atividade enzimática da protease.....	15
2.6 Determinação da atividade enzimática das enzimas fenol oxidase, peroxidase, β -glucosidase, fosfatase ácida e alcalina, β -N-acetilglucosaminidase e sulfatase	16
2.7 Análise estatística	17
3 Resultados.....	19
3.1 Atividade enzimática	19
3.1.1 Sulfatase.....	19
3.1.2 Fenol oxidase	19
3.1.3 β -glucosidase	20
3.1.4 Fosfatase ácida.....	20
3.1.5 Fosfatase alcalina.....	21
3.1.6 β -N-acetilglucosaminidase	21
3.1.7 Protease	22
3.1.8 Urease	22
3.1.9 Desidrogenase.....	23
1.1 Variáveis ambientais	23
1.1.1 Humidade relativa	23
1.1.2 Matéria orgânica.....	24
1.1.3 Salinidade.....	24
1.1.4 pH	25

1.2	Análise estatística	25
1.2.1	Kruskal-Wallis	25
1.2.2	Principal Coordinates Analysis	28
1.2.3	PERMANOVA	29
1.2.4	SIMPER	30
4	Discussão e conclusão	33
5	Bibliografia	37
8.	Anexos	42
8.1	Anexo I - Análise SIMPER, similaridade	43
8.2	Anexo II - Correlações	44

1 Introdução

1.1 Local em estudo e caracterização

Os sapais localizam-se na zona intertidal. Caracterizam-se por serem zonas húmidas sujeitas à influência das marés e apresentam solos salinos. A vegetação dominante é do tipo emergente, sendo no geral tolerante à salinidade e ao encharcamento do solo. Constituem habitats raros e únicos incluindo locais de viveiro para os peixes e locais de reprodução/alimentação para as aves, algumas delas raras cuja observação é economicamente rentável. Estas zonas têm também um papel de extrema importância ao nível dos serviços dos ecossistemas, beneficiando direta ou indiretamente a população humana (Costanza *et al.*, 1997), nomeadamente reciclagem de nutrientes, produção primária (Teixeira, Duarte e Caçador, 2014), habitat para a vida selvagem, no controlo de inundações, erosão e retenção de metais pesados, para o qual as plantas do sapal (halófitas) desempenham uma função chave. Este ecossistema é particularmente vulnerável a mudanças na quantidade e qualidade do abastecimento de água e espera-se que o aquecimento global cause consequências, nomeadamente através da alteração dos regimes hidrológicos (Erwin, 2009), direta e indiretamente pela alteração da temperatura e uso do solo (Ferrati *et al.*, 2005). O sapal de Alcochete, o local onde foi realizado o presente estudo encontra-se inserida na Reserva Natural do Estuário do Tejo ao abrigo do decreto-lei nº 487/77, de 17 de Novembro.

1.2 Espécies em estudo

S. maritima é uma planta de sapal, da família das gramíneas (Poaceae), cuja área de distribuição se estende do Sul de África até ao Norte da Europa, ao longo da costa Atlântica (Mobberley, 1956). Até ao séc. XIX era a única espécie de *Spartina* conhecida na costa atlântica (Marchant & Goodman, 1969). Esta espécie nativa tem um papel importante na colonização primária dos sapais dado que influencia positivamente o processo de sedimentação, tanto na captura como na estabilização, função que é muito importante para facilitar o desenvolvimento da sucessão (Castillo *et al.*, 2000). Distribui-se pela região zona mais baixa do sapal, sendo geralmente dominante.

S. versicolor, também conhecida como *S. durieui*, *S. juncea*, *T. juncea* e *S. patens*, pertencente igualmente à família das gramíneas. É nativa da América do Norte e Central, distribui-se ao longo da costa atlântica de Newfoundland (Canadá) ao Texas, México e em todas as ilhas das Caraíbas (Barkworth, 2003; Beetle, 1977; Liogier & Martorell, 2000; Peterson, 2001). Devido à taxa de decomposição lenta das componentes aéreas da planta de *S. versicolor*, tanto inteiras como parcialmente fragmentadas estas permanecem durante longos períodos de tempo no sapal, características que aumentam a contribuição para a formação de solo neste sistema. Os seus detritos retêm elevadas concentrações de carbono e azoto do ambiente, durante pelo menos 1 ano. Funcionam

assim como sumidouros de nutrientes (Manéndez & Sanmartí, 2007). As recentes alterações ambientais, já enumeradas, tendem a causar alterações biogeoquímicas nos habitats disponíveis para colonização do ecossistema, incluindo nos sapais. As espécies invasoras têm um elevado potencial de colonização, devido à sua grande plasticidade e habilidade de adaptação. *S. versicolor* é uma espécie invasora na europa já presente em alguns países do mediterrâneo, nomeadamente Portugal, Espanha e França (WCSP, 2012).

1.3 O solo, o ciclo de nutrientes e a sua dinâmica

O "reservatório" solo é um local de forte interação entre vários níveis tróficos e diferentes espécies (i.e. organismos bentónicos, microrganismos e plantas), sendo determinante no ciclo de nutrientes e na sustentabilidade dos ecossistemas através do seu complexo adsorvente e da reserva mineral. O ciclo e a disponibilidade de nutrientes está associado ao ciclo do carbono e, naturalmente, ao processo de decomposição dos resíduos orgânicos (Swift *et al.*, 1879).

A concentração dos nutrientes presentes nas folhas que caem no solo (*litterfall*) é diferente da concentração das folhas maduras devido ao processo de senescências. Uma grande parte dos nutrientes contidos são reabsorvidos pela planta, sendo este processo designado por translocação. No entanto nem todo o seu conteúdo nutricional é reabsorvido, caindo para o solo e depositando-se na sua superfície por baixo da planta (Schlesinger, 1997) sob a forma de detritos não decompostos, designados por matéria orgânica morta ou *plant litter*. No solo sofrem processos de decomposição, função desempenhada essencialmente por microrganismos e que levarão à transferência desses mesmos nutrientes para o solo numa forma disponível para as plantas (Swift *et al.*, 1879; Schaefer, 1990), nomeadamente CO₂, H₂O, iões (ex. azoto e fósforo) e compostos orgânicos altamente estáveis designados por *húmus*. Os compostos enumerados acumulam-se nas camadas abaixo da superfície do solo e compõem grande parte da matéria orgânica do solo (Schlesinger, 1977). A matéria orgânica morta e os nutrientes contidos têm um papel de grande importância na dinâmica dos ecossistemas, e são uma peça chave na reciclagem de nutrientes (Swift *et al.*, 1879). Verificou-se que plantas que crescem em áreas com reduzida disponibilidade de nutrientes tendem a produzir resíduos com menor concentração de nutrientes, no entanto uma maior proporção de nutrientes é reabsorvida. A matéria orgânica morta é a principal forma de retorno de nutrientes para o solo, nomeadamente para o azoto (N) e fósforo (P), sendo a sua acumulação na superfície do solo designada por imobilização. Torna-se assim essencial fazer a análise biológica e bioquímica dos parâmetros relacionados com a atividade dos microrganismos para avaliar a qualidade e função do solo (García *et al.*, 1998), uma vez que estes são fundamentais no estabelecimento de ciclos biogeoquímicos, determinantes na disponibilidade de nutrientes para as plantas e influenciam na manutenção e qualidade do solo (Roldán *et al.*, 1994).

1.4 A Rizosfera e a sua influência nas comunidades de microrganismos

A rizosfera é definida como o volume de solo adjacente às raízes das plantas (Hiltner, 1904), onde os microrganismos medeiam processos sob influência do sistema radicular (Berg e Smalla, 2009) e apresenta elevada biomassa e atividade microbiana, provocada pela exsudação das raízes (Berg e Smalla, 2009). Estes exsudados consistem em hidratos de carbono, ácidos orgânicos, aminoácidos, amidas, vitaminas e outros compostos e a sua quantidade e composição variam com a espécie, idade e fase do ciclo de vida, do estado nutricional da planta, de fatores ambientais e determinam a estrutura e composição dos microrganismos da rizosfera (Hines *et al.*, 1999). A sua estrutura e composição vai de encontro à necessidade das plantas de forma a obterem os nutrientes necessários para a sua manutenção e crescimento, a partir da reciclagem da matéria orgânica. Estes compostos libertados pelas raízes das plantas contribuem para o aumento da densidade das comunidades microbianas na rizosfera, uma vez que são um importante fonte de carbono (até 84%) para os microrganismos (Burgmann *et al.*, 2005). Sendo assim, as plantas influenciam a estrutura, diversidade e atividade das populações que compõem as comunidades de microrganismos (Burgmann *et al.*, 2005) e este por sua vez podem também influenciar-se e selecionar-se entre si através de relações de transferência de materiais ou energia ou por relações de antagonismo (Weller, 1988; Lugtenberg *et al.*, 2002). A estrutura da comunidade na vizinhança das raízes são essencialmente influenciadas pela espécie da planta (Duineveld *et al.*, 2001; Grayston *et al.*, 1998; Yang & Crowley, 2000; Kowalchuk *et al.*, 2002) e pelo tipo de solo (van Veen *et al.*, 1997; Da Silva *et al.*, 2003).

As raízes das plantas do ecossistema sapal desenvolvem raízes que cobrem uma área considerável, no sentido de criarem uma superfície mais dinâmica bioquimicamente, suportando diferentes gradientes químicos para o desenvolvimento da microflora. Desta forma consegue-se criar uma maior diversidade de microrganismos e assim satisfazer as várias necessidades nutricionais da planta (Gomes *et al.*, 2001). De forma a controlar e gerir esta comunidade diversificada de microrganismos, as plantas libertam exsudados através das suas raízes para a rizosfera, influenciando o crescimento e a diversidade das comunidades bacterianas. Estas por sua vez vão ter uma importante influência na disponibilidade de substratos no solo (Gomes *et al.*, 2001), por outras palavras os exsudados são sinais químicos simbióticos que atraem e moldam a composição de microrganismos na rizosfera envolvidos na aquisição de nutrientes, de forma a compensar parcialmente a carência de nutrientes, favorecendo o crescimento da planta (Berg e Smalla, 2009). As comunidades bacterianas da rizosfera dos sedimentos da zona em estudo no presente trabalho então envolvidas em processos de decomposição de matéria orgânica (Smith *et al.*, 1993), regeneração de nutrientes inorgânicos (Dudley *et al.*, 2001), processamento de poluentes (Compeau *et al.*, 1985) e reciclagem de nutriente (Tabatabai, 1994; Kandeler, 1996). Fatores como a vegetação, encharcamento do sapal, textura, salinidade, temperatura

e pH regulam a sua atividade (LaRoque *et al.*, 2004). Os principais agentes de degradação inicial dos restos vegetais e da lenhina são os fungos, todavia a maioria dos produtos que resultam da degradação da lenhina são metabolizados pelas bactérias (Masai *et al.*, 2007).

1.5 Os microrganismos, as enzimas e a sua importância

Os microrganismos do solo e as suas enzimas desempenham um papel de extrema importância na manutenção da qualidade e diversidade funcional do ecossistema solo (Tabatabai, 1994; Kandeler, 1996). As suas enzimas são indicadores da qualidade deste ecossistema devido à sua forte correlação com a matéria orgânica e as suas propriedades físicas. Foi por essa razão que recorreu-se ao método descrito no presente trabalho, uma vez que a atividade enzimática responde rapidamente a alterações e sobretudo porque envolve métodos de análise simples e menos dispendiosos comparados com outros indicadores biológicos da qualidade do solo (Jordan *et al.*, 1995; Hojat & Nourbakhsh, 2009). São indicadores da atividade dos microrganismos do solo apresentando-se adsorvidas à superfície dos minerais de argila ou ligadas a colóides húmicos (Burns, 1982; Nannipieri, 1994). As enzimas extracelulares possuem uma atividade genérica, de acordo com o seu grupo funcional, quando libertadas para o meio extracelular e são capazes de metabolizar compostos húmicos, intervindo na oxidação, transformação e mineralização da matéria orgânica (Gramss *et al.*, 1999).

Os grupos funcionais designam-se genericamente fenol oxidase (FOX) para descrever a atividade das enzimas que catalisa a oxidação de polifenóis, consumindo oxigénio e peroxidase (POX) para descrever as enzimas que catalisam a oxidação de vários compostos fenólicos e aminas, usam o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) como aceitador (Sinsabaugh, 2010; Reboreda & Caçador, 2008). São duas enzimas que pertencem à categoria das oxirredutases e intervêm na decomposição do material vegetal (Reboreda & Caçador, 2008). Estes dois grupos de enzimas são expressos para uma grande variedade de propósitos desde a ontogenia, defesa à aquisição de carbono e azoto. São libertadas para o meio ambiente por excreção ou lise celular, onde através da sua atividade agregada intervêm em funções chave do ecossistema, nomeadamente na degradação da lenhina, processos de humificação, mineralização do carbono e exportação do carbono orgânico dissolvido (Sinsabaugh, 2010). A atividade destes dois grupos de enzimas aumenta com o pH e as atividades associadas aos restos vegetais e matéria orgânica particulada correlacionam-se frequentemente com as taxas de decomposição, sendo que a sua atividade potencial varia com a qualidade da matéria orgânica, nomeadamente com a composição em lenhina e tipos de compostos do metabolismo secundário (Sinsabaugh, 2010). Função destes dois grupos funcionais é a aquisição de carbono (para o crescimento das plantas) e outros nutrientes. Relativamente ao processamento de poluentes, a FOX atenuam também a toxicidade das moléculas fenólicas, iões metálicos, atuam como defesa anti microbiana e catalisam reações não

específicas incluindo a oxidação do Mn^{2+} e Fe^{2+} , conseguindo polimerizar, despolimerizar ou transformar moléculas fenólicas (Sinsabaugh, 2010).

As restantes enzimas, a β -glucosidase está envolvida no ciclo do carbono catalisando a etapa final da degradação da celulose; a fosfatase ácida e alcalina estão envolvidas no ciclo do fósforo catalisando a hidrólise de composto orgânicos de fósforo em fosfatos e β -N-acetilglucosaminidase (quitobiase) está envolvida nos ciclos do carbono e azoto catalisando a hidrólise da glucosamina (Acosta-Martínez, 2007). Estas quatro enzimas pertencem à categoria das hidrólases (Reboreda & Caçador, 2008). A urease e a protease estão envolvidas no ciclo do azoto e convertem o azoto orgânico em inorgânico através da hidrólise o primeiro usando substrato ureia e o segundo substrato de péptidos simples (Caravaca *et al.*, 2005).

A desidrogenase está envolvida na transferência de energia oxidativa das células dos microrganismos. Mede a atividade metabólica e por consequência a sua atividade oxidativa nos solos (Friedel, Mølter & Ficher, 1994).

A β -glucosidase é a glucosidase mais abundante nos solos de clima temperado. É responsável pela hidrólise de hidratos de carbono de baixo peso molecular, obtendo-se açúcares como produto final e está envolvida na última etapa limitativa da degradação da celulose. A β -glucosaminidase é uma enzima chave envolvida na hidrólise de resíduos da N-acetil- β -D-glucosamina dos quitoligosacarídeos. Converte a quitina em amino açúcares, a forma mais facilmente mineralizável de carbono e azoto em solos húmidos (Parham & Deng, 2000; Ekenler & Tabatabai, 2002). A fosfatase catalisa a hidrólise de uma diversidade de fosfomonoésteres, sendo muito importante na mineralização do fósforo e nutrição das plantas. Este grupo de enzimas é afetado pelo pH do solo. Este fator abiótico controla a disponibilidade de fósforo no solo independentemente do conteúdo de matéria orgânica. A sulfatase é usada para investigar a mineralização do enxofre orgânico no solo (Acosta-Martínez, 2007).

As enzimas em estudo estão portanto envolvidos na reciclagem de restos de plantas e outros materiais vivos que chegam ao sapal, oxidando-os e transformando-os em nutrientes que serão reabsorvidos pelas plantas. Dado que na literatura não existem muitos estudos sobre a atividade enzimática extracelular em sedimentos de sapal e o seu papel nos ciclos biogeoquímicos (tabela 1) deste ecossistema, torna-se pertinente o desenvolvimento da presente dissertação para a compreensão do seu funcionamento.

Tabela 1 – Enzimas extracelulares em estudo e respetivo ciclo biogeoquímico onde estão envolvidas.

Enzima	Carbono	Azoto	Enxofre	Fósforo
β-glucosidase	X	X		
Quitobiase	X	X		
Fosfatase				X
Sulfatase			X	
Urease		X		
Protease		X		
Fenol oxidase	X	X		
Peroxidase	X	X		

O presente estudo teve como hipótese de trabalho que a atividade enzimática é diferente no rizosedimento de *S. maritima* e *S. versicolor* e foi analisada também a sua variação temporal. Para testar essa hipótese foram estabelecidos dois grandes objetivos: (a) análise da atividade das enzimas fenol oxidase, peroxidase, β-glucosidase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina, quitobiase, sulfatase, desidrogenase, protease e urease no rizosedimento de duas espécies de *Spartina* e (b) medição de alguns dos parâmetros ambientais, nomeadamente humidade, matéria orgânica, pH e salinidade em 4 períodos de amostragem.

2 Materiais e métodos

2.1 Descrição do local e amostragem

A amostragem foi realizada em quatro períodos, Novembro 2012, Fevereiro 2013, Maio 2013 e Fevereiro 2014 no estuário do Tejo (Alcochete), durante a maré baixa. Em cada período de amostragem foram recolhidas aleatoriamente 5 amostras de sedimento para cada uma das espécies de plantas em estudo, nomeadamente *S. maritima* e *S. versicolor*, usando tubos de acrílico com 3,5 cm de diâmetro, até uma profundidade de 11 cm. Os *cores* foram divididos e cortados, removendo os primeiros 3 cm, os restantes 8 cm foram fechados em recipientes de plástico para a posterior análise enzimática e determinação da humidade relativa, matéria orgânica, salinidade e pH do sedimento amostrado. Para determinação da atividade das enzimas fenol oxidase (FOX), peroxidase (POX), β -glucosidase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina, β -N-acetilglucosaminidase (quitobiase), sulfatase, desidrogenase, protease e urease foi usado o sedimento à volta das raízes designado por rizosedimento. A zona superior do sapal encontrava-se colonizada por *S. versicolor* e a inferior por *S. maritima*.

As amostras de rizosedimento das duas espécies de *Spartina* recolhidas foram sujeitas a uma série de testes que se dividem em dois grupos: (a) atividade enzimática, nomeadamente Fenol oxidase, peroxidase, β -glucosidase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina, β -N-acetilglucosaminidase (quitobiase), sulfatase, protease, urease e desidrogenase; e (b) variáveis ambientais, nomeadamente humidade relativa, matéria orgânica e pH. Todos os resultados enzimáticos foram obtidos recorrendo ao método colorimétrico e os valores da absorvância foram lidos no equipamento TECAN Absorbance Microplate Reader (SPECTRA Rainbow).

2.2 Características físico-químicas do sedimento

Para determinar o pH pesou-se 2 g de sedimento e secou-se na estufa a 60 °C, por um período de 24 horas. Adicionou-se 5 ml de água ultra-pura, agitou-se e centrifugou-se a 4000 rpm durante 15 minutos, a 4°C. O valor de pH foi medido no sobrenadante recorrendo ao potenciómetro HANNA pH/mV (HI 9025). A calibração do potenciómetro foi executada utilizando soluções tampão padrão de pH 4 e pH 7.

A matéria orgânica foi determinada através da perda na ignição (LOI), através da queima de 1 g de sedimento a 600 °C durante 3 h. O conteúdo em água no sedimento foi determinado recorrendo à secagem do sedimento (1g) a 60 °C, durante 48 h. Os valores foram expressos em percentagem.

Para medir a salinidade secou-se 1 g de sedimento a 60 °C, durante 48 h de forma a retirar a água intersticial. Adicionou-se 2 ml de água ultra-pura, agitou-se de forma a obter equilíbrio osmótico e

centrifugou-se a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. O valor de salinidade foi medido no sobrenadante recorrendo a um refratômetro (Atago, S/Mill-E) e obtido em permilagem.

2.3 Determinação da atividade enzimática da desidrogenase

A atividade da desidrogenase foi determinada recorrendo ao método do TTC, de acordo com Thalmann (1968). Aproximadamente 2,5 g de sedimento fresco foram incubados com 2,5 ml de solução de TTC (1%). Amostras sem substrato foram também preparadas com 2,5 ml de tampão Tris-HCL (100mM), substituindo o TTC. A incubação decorreu a 30° C, durante 24 horas. Após a incubação adicionou-se a cada tubo 20 ml de acetona e agitou-se. Manteve-se no escuro durante 2 horas e centrifugou-se a 3000 rpm durante 15 minutos, a 4 °C. A absorvância foi lida no sobrenadante recorrendo ao equipamento TECAN *Absorvance Microplate Reader* (Spectra Rainbow) a 546 nm.

2.4 Determinação da atividade enzimática extracelular da urease

Para determinar a atividade enzimática da urease pesou-se 3 g de sedimento para cada tubo previamente descontaminado ⁽¹⁾. Para a reação adicionou-se 3,75 ml de tampão citrato ⁽²⁾ e 5 ml de solução ureia ⁽³⁾. Para o controlo de substrato adicionou-se apenas 3,75 ml de tampão e 5 ml de solução ureia. Incubou-se durante 3 horas a 37 °C. Após este período centrifugou-se a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C e posteriormente retirou-se 1 ml de sobrenadante para um novo tubo adicionando-se 9 ml de água ultra-pura. Para revelar a reação introduziu-se nos tubos de reação 0,5 ml de reagente R1 ⁽⁴⁾ e 0,5 ml de R2 ⁽⁵⁾, agitou-se e deixou-se em repouso *overnight*. Para a leitura da absorvância (630 nm) pipetou-se 200 µl de amostra em cada poço de uma placa de 96 poços. Comparou-se a absorvância lida com uma curva de calibração feita com cloreto de amónia.

2.5 Determinação da atividade enzimática da protease

Para determinar a atividade enzimática da protease pesou-se 3 g de sedimento congelado para cada copo previamente descontaminado ⁽¹⁾ e adicionou-se 15 ml de tampão Tris ⁽⁶⁾. Agitou-se durante 1 minuto e posteriormente aplicou-se ultrassons durante o mesmo período de forma a garantir a disponibilidade do centro ativo das enzimas para a reação. Para a reação pipetou-se 5 ml de amostra e adicionou-se 5 ml de solução caseína ⁽⁷⁾; para o controlo de substrato 5 ml de tampão e 5 ml de caseína e para o controlo de reação 5 ml de amostra e 5 ml de tampão. Posteriormente incubou-se todos os tubos durante 2 horas a 50 °C.

Após este passo acrescentou-se 1 ml de TCA ⁽⁸⁾ para todos os tubos e centrifugou-se a 2000 rpm durante 15 minutos, a 4 °C. Retirou-se 1 ml de sobrenadante. Fez-se reagir 1 ml de Follin-Ciocolteu deixando reagir durante 2 minutos. Adicionou-se 2,5 ml de Na₂CO₃, agitou-se e colocou-se em repouso durante 15 minutos, à temperatura ambiente.

Após este período pipetou-se 200 µl para cada poço de uma placa de 96 poços, tendo sido lida a absorvância a 700 nm e comparada com uma curva de calibração feita com tirosina. Para a determinação dos sólidos em suspensão pipetou-se 2 ml de cada amostra para dois cadinhos.

2.6 Determinação da atividade enzimática das enzimas fenol oxidase, peroxidase, β-glucosidase, fosfatase ácida e alcalina, β-N-acetilglucosaminidase e sulfatase

De forma a determinar-se a atividade enzimática das enzimas fenol oxidase, peroxidase, β-glucosidase, fosfatase ácida e alcalina, β-N-acetilglucosaminidase e sulfatase dissolveu-se aproximadamente 5 g de sedimento em 60 ml de solução tampão acetato de sódio ⁽⁹⁾, misturou-se durante 1 minuto e submeteu-se a ultrassons durante o mesmo período de tempo. Pipetou-se 2 ml de solução de solo dissolvido para determinação do peso seco. Para a incubação pipetou-se 2 ml de solução de solo, três replicados por amostra de solo e dois replicados para o controlo de amostra, e procedeu-se segundo a tabela 2.

Tabela 2 – Procedimento para preparação da incubação.

Amostra	2 ml de amostra (triplicados)
Controlo amostra	2 ml de amostra (duplicados)
Controlo substrato	2 ml acetato (duplicados)

Para a incubação das enzimas fenol oxidase e peroxidase procedeu-se da seguinte forma:

- Amostra: 2 ml de substrato L-DOPA 5 mM (+ 0,1 ml de H₂O₂ a 0,3% na peroxidase)
- Controlo amostra: 2 ml de tampão acetato ⁽⁹⁾ (+ 0,1 ml de H₂O₂ a 0,3% na peroxidase)
- Controlo substrato: 2 ml de substrato L-DOPA 5 mM (+ 0,1 de H₂O₂ a 0,3% na peroxidase).

Para a incubação das enzimas β-glucosidase, fosfatase ácida, quitobiase e sulfatase procedeu-se da seguinte forma:

- Amostra: 2 ml de substrato correspondente:
 1. p-Nitrofenil-sulfate 5 mM
 2. P-nitrofenil-β-D-glucopiranosida 5mM
 3. P-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamina 5mM
- Controlo amostra: 2ml de tampão acetato
- Controlo substrato: 2 ml do substrato correspondente.

Para incubação da enzima fosfatase alcalina:

- Amostra: 2 ml do substrato p-nitrofenil-fosfato 5 mM
- Controlo amostra: 2 ml de tampão Tris ⁽¹⁰⁾
- Controlo substrato: 2 ml do substrato correspondente

Agitou-se e colocou-se todos os tubos a 30 °C aplicando os seguintes tempos de incubação: 30 minutos para a fosfatase ácida, 60 minutos para a fenol oxidase, peroxidase, β -glucosidase, sulfatase e fosfatase alcalina e 120 minutos para a quitobiase.

Após a incubação para as enzimas fenol oxidase e peroxidase centrifugou-se os tubos a 2000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. A leitura da absorvância a 460 nm fez-se diretamente do sobrenadante e comparou-se com a curva padrão do L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina). Os valores da peroxidase foram lidos diretamente da curva padrão e os valores da peroxidase foram obtidos subtraindo os valores da enzima fenol oxidase do total. O resultado foi exprimido em micromoles de substrato consumido. g^{-1} sedimento seco . hora⁻¹.

Para as enzimas β -glucosidase, fosfatase ácida e alcalina, quitobiase e sulfatase adicionou-se imediatamente aos respetivos tubos 0,2 ml de NaOH 0,1 N ⁽¹¹⁾ para parar a reação e provocar a mudança de cor do pNP libertado. Logo de seguida centrifugou-se a 2000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Após este processo. A leitura da absorvância foi feita a 410 nm e os valores foram comparados com a curva padrão do pNP. O resultado foi expresso em micromoles . g^{-1} sedimento fresco . hora⁻¹.

2.7 Análise estatística

Para calcular se as amostras de rizosedimento recolhidas no estuário do Tejo provêm de populações diferentes realizou-se a análise das médias de cada uma das variáveis em estudo no *software Statistica* (Statasoft Inc., versão 12). Devido à ausência de normalidade e homogeneidade dos dados obtidos usou-se testes não paramétricos, nomeadamente Spearman para analisar de correlação entre os fatores ambientais em estudo e as atividades enzimáticas e o teste não paramétrico Kruskal-Wallis para determinar as diferenças significativas entre: (a) espécies (*S. maritima* e *S. versicolor*) para cada uma das variáveis, nomeadamente FOX, POX, β -glucosidase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina, quitobiase, sulfatase, desidrogenase, protease e urease e (b) períodos temporais. O *software* PRIMER (PRIMER-E Ltd., versão 6) foi utilizado para executar a análise PCO (*Principal Coordinate Analysis*). Esta análise consiste na ordenação das amostras num espaço de dimensões reduzidas segundo uma matriz de distância Euclidiana (Bray Curtis), preservando a distância das suas relações. A análise PERMANOVA foi usada para detetar quais os fatores responsáveis pela divisão por espécies. Trata-se de um teste robusto que permite fazer uma análise multivariada aos dados usando um modelo experimental para determinar diferenças entre fatores e variáveis. Os dados não têm de seguir distribuição normal e recorre a permutações, podendo ser usado qualquer tipo de distância que seja apropriada aos dados. O método identificou as diferenças significativas na atividade enzimática das enzimas FOX, POX, β -glucosidase, fosfatase ácida, fosfatase alcalina, quitobiase, sulfatase, desidrogenase, protease e urease no rizosedimento das duas espécies de *Spartina*. A análise SIMPER foi usada para identificar a

contribuição para a similaridade (ou dissimilaridade) observada em cada uma das espécies (*S. maritima* e *S. versicolor*) entre as amostras, de cada uma das enzimas em estudo.

⁽¹⁾ Descontaminação: banho de HCl a 5% durante 24 horas.

⁽²⁾ Tampão citrato 50 mM, pH 6.7: 0,3575g de ácido cítrico e 14,205g de citrato de sódio num volume final de 1000 ml de água ultra-pura.

⁽³⁾ Solução ureia a 10%: 10g de ureia num volume final 100 ml de tampão citrato

⁽⁴⁾ R1: 35g de Fenol e 400mg de nitroprussiato de sódio num volume final de 100 ml de água ultra-pura.

⁽⁵⁾ R2: 280g de citrato bisódio em 22g de hidróxido de sódio dihidratado (NaOH) e 34,5 ml de hipoclorito de sódio (NaOCl) num volume final de 1000 ml de água ultra-pura.

⁽⁶⁾ Tampão Tris 0,05M, pH 9.1: 6,057g de Tris sólido num volume final de 1000 ml de água ultra-pura. Acerto de pH com HCl concentrado.

⁽⁷⁾ Caseína a 2%: 2g de caseína num volume final de 100 ml de tampão Tris 0,05M

⁽⁸⁾ TCA 17,5%: 8,75g de TCA num volume final de 50 ml de água ultra-pura.

⁽⁹⁾ Tampão acetato 50 mM, pH 5.0: 4,152g de acetato de sódio em 1000 ml de água ultra-pura. Acertou-se o pH com ácido acético.

⁽¹⁰⁾ Tampão Tris 100 mM, pH 8.7: 12,114g acetato de Tris em 1000 ml de água ultra-pura.

⁽¹¹⁾ NaOH 0,1 N: 0,4g de NaOH em 100 ml de água ultra-pura.

3 Resultados

3.1 Atividade enzimática

3.1.1 Sulfatase

A atividade da enzima extracelular sulfatase (fig. 1) foi muito baixa ao longo do tempo no rizosedimento da *S. maritima*. Registou-se um pico de atividade em *S. versicolor* durante o Inverno e também no Verão. Verificou-se a existência de diferenças significativas na atividade desta enzima entre as duas espécies e em cada espécie observou-se diferenças temporais significativas, nomeadamente entre o Inverno e o Verão (tabela 3).

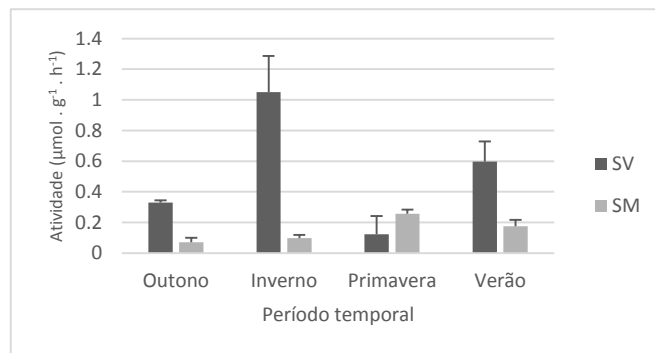


Figura 1 – Média e respetivo erro padrão da atividade da enzima extracelular sulfatase no rizosedimento das espécies *S. versicolor* (SV) e *S. maritima* (SM) por período temporal, nomeadamente Outono, Inverno, Primavera e Verão.

3.1.2 Fenol oxidase

Verificou-se a existência de diferenças significativas da atividade da enzima fenol oxidase no rizosedimento das duas espécies. A atividade desta enzima no rizosedimento de *S. versicolor* ficou abaixo do limite de deteção do teste realizado, não sendo possível quantificar (fig. 2). Como consequência verificou-se diferenças significativas na expressão desta enzima entre o rizosedimento as duas espécies (tabela 3). Não foram identificadas diferenças temporais.

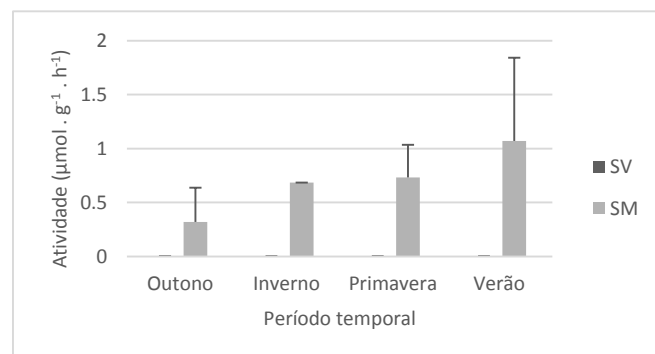


Figura 2 - Média e respetivo erro padrão da atividade da enzima extracelular fenol oxidase no rizosedimento das espécies *S. versicolor* (SV) e *S. maritima* (SM) por período temporal, nomeadamente Outono, Inverno, Primavera e Verão.

3.1.3 β -glucosidase

A análise da atividade da enzima extracelular β -glucosidase (fig. 3), mostrou uma variação temporal significativa em ambas as espécies. A atividade foi maior nos meses mais frios (Outono e Inverno) no rizosedimento da *S. versicolor*, tendo-se observado uma diferença muito pouco expressiva na atividade enzimática das comunidades de microrganismos associados à espécie nativa *S. maritima*. Relativamente à diferença entre espécies, confirmou-se a existência de diferenças significativas na expressão da β -glucosidase (tabela 3).

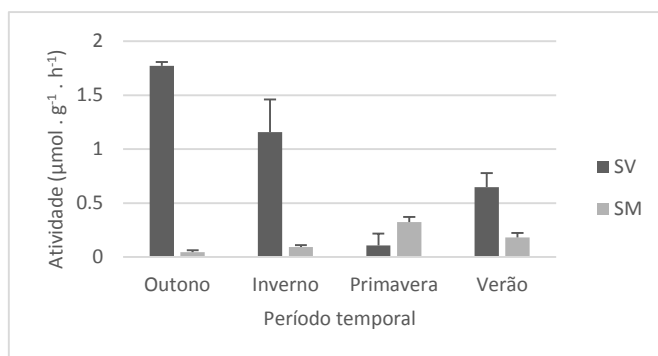


Figura 3 - Média e respetivo erro padrão da atividade da enzima extracelular β -glucosidase no rizosedimento das espécies *S. versicolor* (SV) e *S. maritima* (SM) por período temporal, nomeadamente Outono, Inverno, Primavera e Verão.

3.1.4 Fosfatase ácida

A atividade da enzima extracelular fosfatase ácida (fig. 4), registou dois picos de atividade no Inverno e no Verão em *S. versicolor* e um aumento da atividade no rizosedimento de *S. maritima* na Primavera e Verão. Verificou-se que existem diferenças temporais significativas em cada uma das espécies, nomeadamente entre os meses Outono-Primavera e Inverno-Primavera para *S. maritima* e Inverno-Primavera para *S. versicolor* (tabela 4). Relativamente à atividade enzimática do rizosedimento entre as duas espécies de macrófitas, não se verificou diferenças significativas (tabela 3).

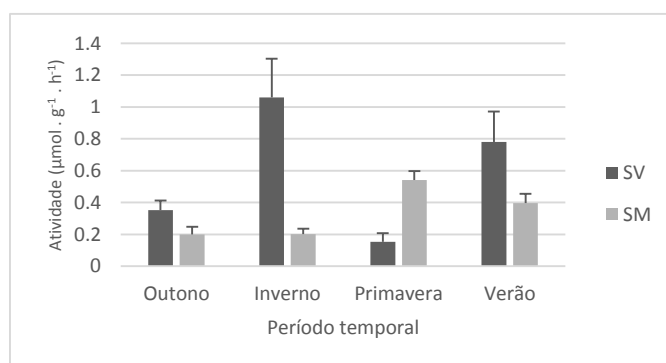


Figura 4 - Média e respetivo erro padrão da atividade da enzima extracelular fosfatase ácida no rizosedimento das espécies *S. versicolor* (SV) e *S. maritima* (SM) por período temporal, nomeadamente Outono, Inverno, Primavera e Verão.

3.1.5 Fosfatase alcalina

A atividade da enzima fosfatase alcalina (fig. 5) foi superior no rizosedimento de *S. versicolor* comparativamente com a *S. maritima*, com exceção na Primavera tendo-se obtido diferenças significativas entre as duas espécies (tabela 3). O teste de Kruskal-Wallis identificou diferenças temporais significativas apenas em SV entre os meses Primavera-Verão (tabela 4).

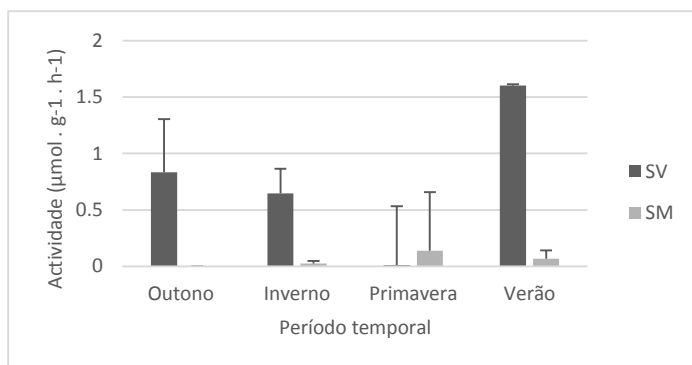


Figura 5 - Média e respetivo erro padrão da atividade da enzima extracelular fosfatase alcalina no rizosedimento das espécies *S. versicolor* (SV) e *S. maritima* (SM) por período temporal, nomeadamente Outono, Inverno, Primavera e Verão.

3.1.6 β -N-acetilglucosaminidase

A atividade da enzima extracelular quitobiase (fig. 6) foi baixa, tendo-se verificado um pico no rizosedimento de *S. maritima* no Inverno e no Verão. Confirmou-se ainda a existência de diferenças temporais significativas na atividade, nomeadamente entre os meses Inverno-Primavera para ambas as espécies (tabela 4) e entre as duas espécies (tabela 3).

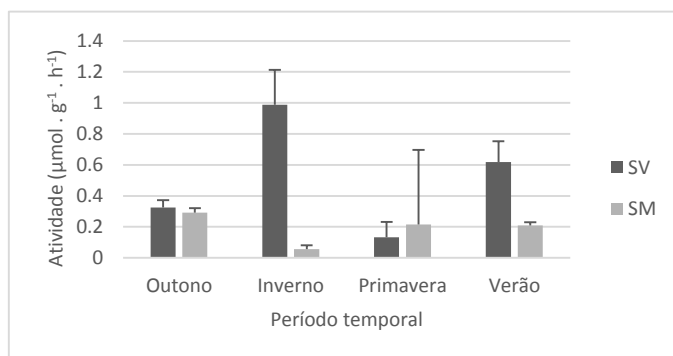


Figura 6 - Média e respetivo erro padrão da atividade da enzima extracelular quitobiase no rizosedimento das espécies *S. versicolor* (SV) e *S. maritima* (SM) por período temporal, nomeadamente Outono, Inverno, Primavera e Verão.

3.1.7 Protease

A enzima protease (fig. 7) registou atividade elevada e seguiu o mesmo padrão nas duas espécies, obteve-se um pico no rizosedimento de *S. versicolor* durante a Primavera e igualmente em *S. maritima*. Detetou-se a ausência variações temporais significativas dentro de cada espécie (tabela 4) e na atividade entre estas (tabela 3).

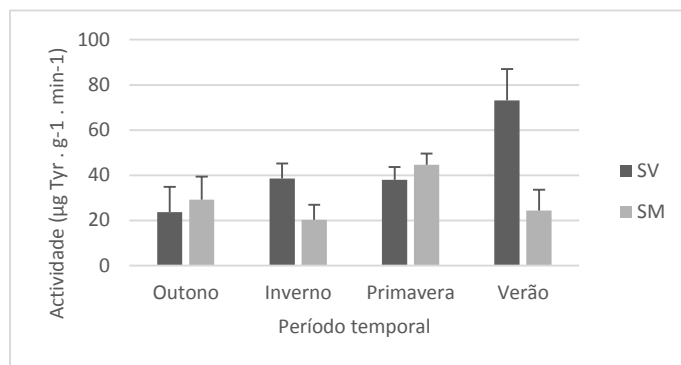


Figura 7 - Média e respetivo erro padrão da atividade da enzima extracelular protease no rizosedimento das espécies *S. versicolor* (SV) e *S. maritima* (SM) por período temporal, nomeadamente Outono, Inverno, Primavera e Verão.

3.1.8 Urease

A atividade da urease (fig. 8) apresentou-se constante e semelhante no rizosedimento das duas espécies ao longo dos vários períodos de amostragem, com exceção do Inverno em que a atividade no rizosedimento da *S. maritima* foi mais baixa. O teste Kruskal-Wallis não identificou diferenças significativas (tabela 4). Comparando os dados das duas espécies, verificou-se que as atividades são muito semelhantes não existindo diferenças significativas (tabela 3).

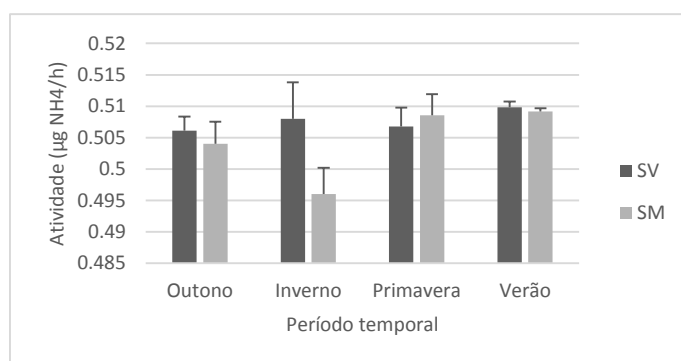


Figura 8 - Média e respetivo erro padrão da atividade da enzima extracelular urease no rizosedimento das espécies *S. versicolor* (SV) e *S. maritima* (SM) por período temporal, nomeadamente Outono, Inverno, Primavera e Verão.

3.1.9 Desidrogenase

A atividade da enzima desidrogenase (fig. 9) em *S. versicolor* ficou abaixo do limite de detecção do teste, não sendo assim possível quantificar. No rizosedimento da *S. maritima*, observou-se um pico de atividade na Primavera. O Verão foi o período com menor atividade enzimática, seguido pela Primavera e Inverno. Identificou-se a existência de diferenças significativas temporais para esta última espécie entre os meses Outono-Primavera e Outono-Verão (tabela 4). Apurou-se que existem igualmente diferenças significativas entre as duas espécies (tabela 3).

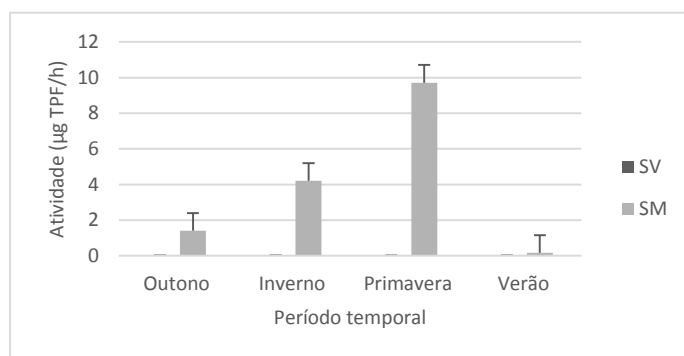


Figura 9 - Média e respetivo erro padrão da atividade da enzima membrana desidrogenase no rizosedimento das espécies *S. versicolor* (SV) e *S. maritima* (SM) por período temporal, nomeadamente Outono, Inverno, Primavera e Verão.

1.1 Variáveis ambientais

1.1.1 Humidade relativa

O rizosedimento de *S. maritima* apresenta maior percentagem de humidade (fig. 10), cerca de 30% relativamente ao rizosedimento de *S. versicolor*, aproximadamente metade desse valor. Os dados indicam diferenças significativas entre as duas espécies (tabela 3), no entanto não houve diferenças temporais significativas para a espécie *S. maritima* e *S. versicolor* (tabela 4).

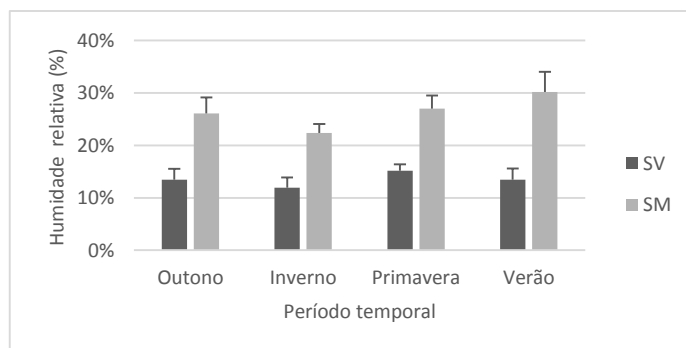


Figura 10 - Variação temporal da humidade relativa no rizosedimento das espécies *S. versicolor* (SV) e *S. maritima* (SM), ao longo dos períodos Outono, Inverno, Primavera e Verão.

1.1.2 Matéria orgânica

A análise ao teor da matéria orgânica do rizosedimento (fig. 11) revelou que o rizosedimento da *S. maritima* apresenta maior percentagem de matéria orgânica comparativamente com *S. versicolor*, atingindo o seu valor máximo no Verão e o valor mais baixo na Primavera. Estas diferenças temporais são significativas apenas para *S. versicolor*, nomeadamente entre os meses Primavera-Verão (tabela 4). Existem diferenças significativas entre as duas espécies (tabela 3).

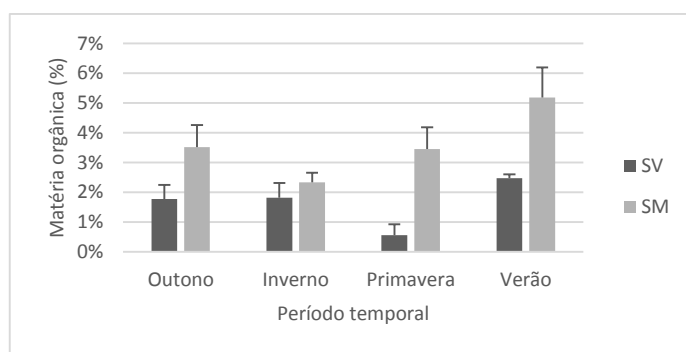


Figura 11 – Variação temporal da matéria orgânica no rizosedimento das espécies *S. versicolor* (SV) e *S. maritima* (SM), ao longo dos períodos Outono, Inverno, Primavera e Verão.

1.1.3 Salinidade

Relativamente ao parâmetro salinidade (fig. 12), identificou-se a salinidade mais elevada durante o Outono, diminuição no Inverno, atingindo o mínimo na Primavera, voltando a aumentar no Verão. De destacar que a recolha das amostras relativas ao Verão coincidiu com um período de muita precipitação que se prolongou por vários dias. Confirmou-se que a existência de diferenças temporais significativas entre os meses Outono-Primavera para *S. maritima* e não se verificou diferenças significativas para *S. versicolor* (tabela 4). Entre as duas espécies a existência de diferenças significativas de salinidade (tabela 3).

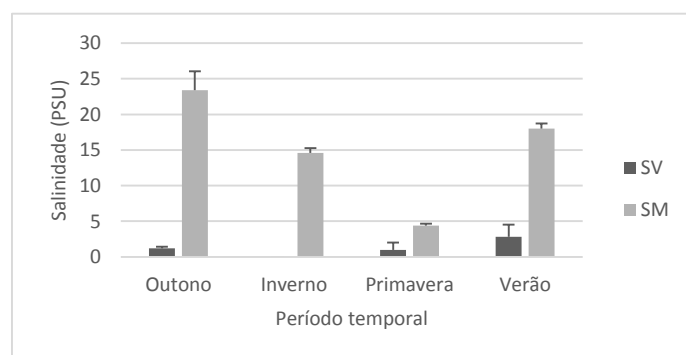


Figura 12 - Variação temporal da salinidade no rizosedimento das espécies *S. versicolor* (SV) e *S. maritima* (SM), ao longo dos períodos Outono, Inverno, Primavera e Verão.

1.1.4 pH

Relativamente ao pH (fig. 13), no rizosedimento da *S. versicolor* o pH registou valores de cerca de 7 no Outono e Primavera e 8 no Inverno e Primavera. Relativamente a *S. maritima* o pH manteve-se constante variando apenas entre 7,5 e 8. Observou-se uma variação temporal significativa, nomeadamente entre os meses Inverno-Verão para *S. maritima* e Outono-Inverno, Outono-Primavera para *S. versicolor* (tabela 4) e diferenças significativas entre as duas espécies (tabela 3).

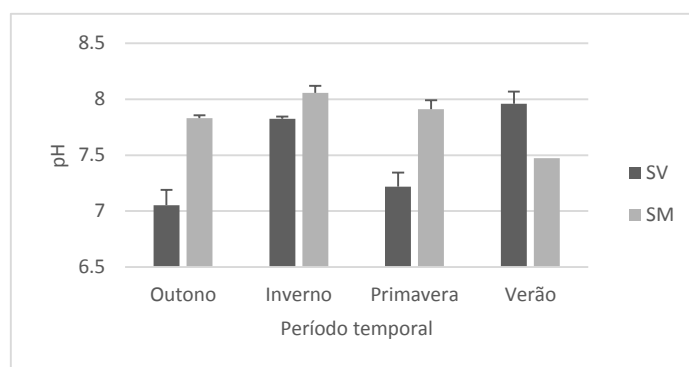


Figura 13 - Variação temporal do pH no rizosedimento das espécies *S. versicolor* (SV) e *S. maritima* (SM), ao longo dos períodos Outono, Inverno, Primavera e Verão.

Verificou-se no geral um aumento de atividade da expressão enzimática no rizosedimento de *S. versicolor*, nomeadamente nas enzimas fosfatase ácida, β -glucosidase e sulfatase. A primavera foi o único período temporal em que se verificou que a atividade enzimática das enzimas sulfatase, β -glucosidase, fosfatase ácida e alcalina, quitobiase, protease e urease foi superior no rizosedimento de *S. maritima*. No outono também houve maior atividade da protease no rizosedimento de *S. maritima*, tendo em *S. versicolor* sido menor. Estes resultados coincidem com um menor valor de pH no rizosedimento de *S. versicolor*, sendo que em *S. maritima* este foi superior.

1.2 Análise estatística

1.2.1 Kruskal-Wallis

Relativamente ao teste Kruskal-Wallis foram colocadas duas hipóteses:

1. Há diferenças significativas entre os rizosedimento de *S. maritima* e *S. versicolor* para cada uma das variáveis?

Tabela 3 – Resultado do teste Kruskal-Wallis para análise de significância (p-value < 0.05) de cada uma das variáveis (enzimas e variáveis ambientais), entre espécies. Para valores acima de 0.05, não se verifica diferenças significativas; para valores abaixo de 0.05, verifica-se diferenças significativas.

Variáveis	Kruskal-Wallis (p)
FOX	0.006830
POX	0.498881
β-glucosidase	0.004703
Fosfatase ácida	0.185020
Fosfatase alcalina	0.008694
Quitobiase	0.000877
Sulfatase	0.002449
Desidrogenase	0.000001
Protease	0.104588
Urease	0.316898
Humidade	0.000004
LOI	0.000152
pH	0.019292
Salinidade	0.000000

Verificaram-se diferenças significativas entre as atividades das enzimas FOX, β-glucosidase, fosfatase alcalina, quitobiase, sulfatase, desidrogenase no rizosedimento da *S. maritima* e *S. versicolor* e foram identificadas variações significativas das variáveis físico-químicas entre os dois locais de recolha de sedimento, nomeadamente na humidade, LOI, pH e salinidade. Verificou-se assim que as condições ambientais entre cada um dos locais onde as espécies se encontram, são diferentes.

2. Dentro de cada espécie e para cada variável há diferenças significativas entre períodos de amostragem?

Tabela 4 – Resultado do teste Kruskal-Wallis para análise de significância (p -value < 0.05) de cada uma das variáveis (enzimas e abiótico), para cada espécie e tendo em conta o período temporal de forma a identificar os pares de meses responsáveis pelas diferenças significativas observadas na tabela anterior. Para valores acima de 0.05, não se verifica diferenças significativas; para valores abaixo de 0.05, verificam-se diferenças significativas.

Variável	<i>S. maritima</i> Kruskal- Wallis (p)	<i>S. maritima</i> Resultado	<i>S. versicolor</i> Kruskal- Wallis (p)	<i>S. versicolor</i> Resultado
FOX		Não existem ≠ significativas		Não existem ≠ significativas
POX		Não existem ≠ significativas		Não existem ≠ significativas
β-glucosidase	0.003744	Outono-Primavera	0.011602	Inverno-Primavera
Fosfatase ácida	0.023379	Outono-Primavera	0.016557	Inverno-Primavera
	0.019701	Inverno-Primavera		---
Fosfatase alcalina		Não existem ≠ significativas	0.013879	Primavera-Verão
Quitobiase	0.048886	Inverno-Primavera	0.011602	Inverno-Primavera
Sulfatase	0.023379	Outono-Primavera	0.011602	Inverno-Primavera
Desidrogenase	0.027671	Outono-Primavera		Não existem ≠ significativas
	0.045158	Outono-Verão		---
Protease		Não existem ≠ significativas		Não existem ≠ significativas
Urease		Não existem ≠ significativas		Não existem ≠ significativas
Humidade		Não existem ≠ significativas		Não existem ≠ significativas
LOI		Não existem ≠ significativas	0.045158	Primavera-Verão
pH	0.001355	Inverno-Verão	0.035454	Outono-Inverno
		---	0.010598	Outono-Primavera
Salinidade	0.001669	Outono-Primavera		Não existem ≠ significativas

Com o objetivo de identificar quais os períodos de amostragem responsáveis pelas diferenças entre *S. maritima* e *S. versicolor* verificadas na tabela 3, executou-se novo teste de Kruskal-Wallis. Isolou-se cada espécie e para cada enzima comparou-se os vários períodos de amostragem (tabela 4). O rizosedimento das duas espécies apresentam diferenças significativas relativamente às seguintes enzimas: FOX, POX, protease e urease. As enzimas β -glucosidase e fosfatase ácida apresentam diferenças entre os meses Outono-Primavera e Inverno-Primavera para as duas espécies de macrófitas, diferenças significativas foram ainda detetadas entre os meses Inverno-Primavera. A fosfatase alcalina não apresenta diferenças significativas entre as 4 datas de amostragem de rizosedimento de *S. maritima*, no entanto houve diferenças entre o período Primavera - Verão. A enzima quitobiase apresenta diferenças no rizosedimento das duas espécies de sapal estudadas entre o Inverno e a Primavera, a sulfatase entre o período Outono - Primavera no rizosedimento de *S. maritima* e entre Inverno - Primavera para *S. versicolor*. Relativamente à desidrogenase, não foram identificadas diferenças no rizosedimento de *S. versicolor*, no entanto no rizosedimento de *S. maritima* verificaram-se diferenças entre o período Outono - Primavera.

1.2.2 Principal Coordinates Analysis

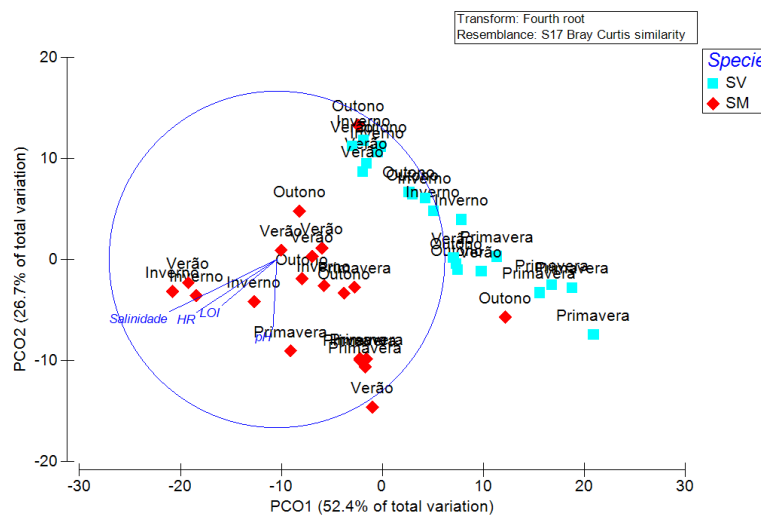


Figura 14 – Análise PCO. Encontram-se representados dois grupos que não se sobrepõem, os losangos representam a espécie *S. maritima* e os quadrados a *S. versicolor*. Encontra-se também presente uma sobreposição com as variáveis abióticas (pH, LOI, humidade relativa e salinidade).

A análise PCO (*Principal Coordinate Analysis*) ordena as amostras num espaço de dimensões reduzidas segundo uma matriz de distância Euclidiana (Bray Curtis), preservando a distância das suas relações. O resultado da ordenação permite identificar a separação do rizosedimento das duas espécies (fig. 14). Cada um corresponde a uma das espécies em estudo, nomeadamente *S. versicolor* e *S. maritima*, havendo uma forte influência dos fatores ambientais na atividade enzimática do rizosedimento das duas espécies. No entanto esta influência é inversamente proporcionalmente entre as duas espécies. A ordenação mostrou que a salinidade é o fator que melhor explica, seguido pela humidade e a LOI.

São responsáveis pela ordenação obtida e indicam que as condições ambientais dos locais colonizados pelas espécies em estudo são diferentes. Os resultados indicam que a espécie *S. maritima* é fortemente influenciada pelos fatores ambientais, observando-se maior dispersão dos dados e *S. versicolor* é menos influenciada, verificando-se um maior agrupamento dos dados.

1.2.3 PERMANOVA

A análise PERMANOVA foi realizada para detetar as diferenças entre as espécies *S. maritima* e *S. versicolor* e entre períodos de amostragem seguindo um delineamento a dois fatores: (a) período temporal (fixo e ortogonal), com 4 níveis e (b) espécie (fixo e ortogonal), com 2 níveis.

Tabela 5 – Detalhes do teste PERMANOVA a dois fatores (“espécie” com 2 níveis e “tempo” com 4 níveis, fatores fixos). Os números a negrito indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

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				

A análise PERMANOVA detetou diferenças significativas entre o rizosedimento das espécies estudadas ($P(\text{perm}) = 0,001$), períodos temporais ($P(\text{perm}) = 0,001$) e dentro de cada espécie diferenças entre períodos temporais ($P(\text{perm}) = 0,001$) (tabela 5).

Tabela 6 – Detalhes do teste PERMANOVA pareado à posteriori (“espécie” com 2 níveis e “período temporal” com 4 níveis, fatores fixos). Os números a negrito indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Termo	Nível	t	P (perm)	Permutações únicas	P (MC)
Sp x Se	Outono	1,8101	0,038	126	0,041
	Inverno	4,1745	0,012	126	0,001
	Primavera	4,9893	0,01	126	0,001
	Verão	2,7591	0,011	126	0,004

Tabela 7 – Detalhes do teste PERMANOVA pareado à posteriori, similaridade entre as espécies *S. versicolor* e *S. maritima* (“espécie” com 2 níveis e “período temporal” com 4 níveis, fatores fixos).

Período	Similaridade média entre grupos	
	SV	SM
Outono	SV	90,005
	SM	82,967
Inverno	SV	91,09
	SM	76,326
Primavera	SV	89,185
	SM	77,164
Verão	SV	88,701
	SM	81,146

Resultados dos testes realizados à *posteriori* indicam igualmente que existem diferenças significativas entre as duas espécies de *Spartina* ($t = 5,4979$; $P(\text{perm}) = 0,001$, 999 permutações). Relativamente às diferenças entre espécies tendo em conta o período temporal verificou-se que existem diferenças significativas no Inverno ($t = 4,1745$; $P(\text{MC}) = 0,001$; 126 permutações), na Primavera ($t = 4,9893$; $P(\text{MC}) = 0,001$; 126 permutações) e no Verão ($t = 2,7591$; $P(\text{MC}) = 0,004$; 126 permutações). Relativamente ao Outono verificaram-se diferenças pouco expressivas entre as duas espécies ($t = 1,8101$; $P(\text{MC}) = 0,041$; 126 permutações) (tabela 6). Na tabela 7 os resultados indicam as duas espécies não são muito diferentes, sendo que no Outono e Verão registou-se os valores mais elevados (82,967 e 81,146, respetivamente) sendo muito semelhantes entre si, seguido pelo Inverno e Primavera (76,326 e 77,164, respetivamente), igualmente com valores muito semelhantes.

1.2.4 SIMPER

No sentido de identificar quais as enzimas que estão a contribuir para a semelhança entre as espécies *S. maritima* e *S. versicolor* executou-se uma análise SIMPER de forma a obter a similaridade (Anexo I). Para *S. versicolor* a protease é a enzima com maior contribuição seguida pela peroxidase. Para a espécie *S. maritima* a protease é a enzima com maior contribuição seguida novamente pela peroxidase como observado no rizosedimento de *S. versicolor*. Relativamente à variação temporal (Anexo I), as enzimas com a maior contribuição para a similaridade entre os períodos de amostragem foram a protease e a peroxidase. Para identificar quais as enzimas que estão a contribuir para a diferença entre as espécies *S. maritima* e *S. versicolor* executou-se igualmente uma análise SIMPER, mas desta vez para a dissimilaridade. A análise de dissimilaridade entre as duas espécies (tabela 8) identificou-se que as enzimas protease, desidrogenase, fosfatase alcalina e peroxidase são as com maior contribuição. A dissimilaridade temporal (tabela 9) mostrou que as enzimas com maior contribuição para a dissimilaridade são as mesmas em todos os períodos temporais, nomeadamente protease,

desidrogenase, fosfatase alcalina e fenol oxidase, no entanto houve variação da percentagem da contribuição e abundância dos grupos enzimáticos entre as duas espécies e entre períodos de amostragem. Comparando o período Outono com o Inverno, verificou-se com exceção da protease que todas as restantes enzimas, nomeadamente desidrogenase, fosfatase alcalina, fenol oxidase, peroxidase, β -glucosidase, quitobiase e sulfatase foram mais abundantes no rizosedimento de *S. maritima*. Relativamente ao período de mostragem Primavera - Outono e Primavera – Inverno (dissimilaridade mais elevada da análise) verificou-se que possuem o mesmo padrão, sendo que as enzimas protease, desidrogenase e fosfatase alcalina possuem maior abundância em *S. maritima*. As enzimas β -glucosidase, sulfatase e fosfatase ácida foram mais abundantes no rizosedimento de *S. versicolor*. Apenas se verificou exceção nas enzimas FOX e POX. Comparando o período Primavera com o Verão a contribuição segue exatamente a mesma ordem de contribuição para a dissimilaridade de Primavera-Inverno, no entanto a abundância inverteu-se, ou seja, o primeiro grupo enumerado é mais abundante no rizosedimento de *S. versicolor* e o segundo em *S. maritima*. No Outono-Verão, a abundancia média da protease e fosfatase alcalina foi superior em *S. versicolor* e das enzimas desidrogenase, POX, β -glucosidase, FOX, quitobiase e fosfatase alcalina superior em *S. maritima*. Por último, no Inverno-Verão (dissimilaridade mais baixa da análise) a abundância média das enzimas protease, desidrogenase e quitobiase foi superior em *S. maritima* e as restantes enzimas, nomeadamente FOX, fosfatase alcalina, POX e β -glucosidase foi superior em *S. versicolor*.

Tabela 8 – Análise SIMPER, dissimilaridade *S. versicolor* vs *S. maritima*

Enzima	Abundância média		Contribuição (%)	Dissimilaridade média
	SV	SM		
Protease	2,46	2,24	26,13	20,86
Desidrogenase	0,00	0,49	24,71	
Fosfatase alcalina	0,24	0,09	10,45	
FOX	0,00	0,18	8,87	
POX	0,59	0,60	6,79	
β-glucosidase	0,26	0,21	6,63	
Sulfatase	0,26	0,21	5,97	
Fosfatase ácida	0,33	0,31	5,29	

Tabela 9 – Análise SIMPER, dissimilaridade temporal e respetiva dissimilaridade média

	Inverno				Primavera				Verão						
	Enzima	Abundância média		Contribuição (%)	Dissimilaridade média	Enzima	Abundância média		Contribuição (%)	Dissimilaridade média	Enzima	Abundância média		Contribuição (%)	Dissimilaridade média
		SV	SM				SV	SM				SV	SM		
Outono	Protease	2,32	2,08	28,95	17,70	Protease	2,32	2,74	29,52	18,97	Protease	2,32	2,25	30,71	15,91
	Desidrogenase	0,12	0,25	16,34		Desidrogenase	0,12	0,31	16,78		Desidrogenase	0,12	0,31	21,20	
	Fosfatase alcalina	0,11	0,18	11,91		Fosfatase alcalina	0,11	0,26	13,16		Fosfatase alcalina	0,11	0,10	10,59	
	FOX	0,00	0,14	8,86		FOX	0,54	0,61	8,46		FOX	0,54	0,61	9,25	
	POX	0,54	0,63	8,64		β -glucosidase	0,20	0,17	7,29		β -glucosidase	0,20	0,27	6,90	
	β -glucosidase	0,20	0,28	7,44		FOX	0,00	0,14	7,12		FOX	0,00	0,09	5,84	
	Quitobiase	0,17	0,21	6,57		Fosfatase ácida	0,30	0,27	6,56		Quitobiase	0,17	0,23	5,30	
	Sulfatase	0,22	0,28	5,98		Sulfatase	0,22	0,17	6,51		Fosfatase ácida	0,30	0,36	5,11	
Inverno						Protease	2,08	2,74	34,16		Protease	2,08	2,25	29,12	
						Desidrogenase	0,25	0,31	15,05		Desidrogenase	0,25	0,31	19,96	
						Fosfatase alcalina	0,18	0,26	8,80		FOX	0,14	0,09	11,00	
						FOX	0,14	0,14	8,34		Fosfatase alcalina	0,18	0,10	10,13	
						β -glucosidase	0,28	0,17	7,68		POX	0,63	0,61	7,43	
						Sulfatase	0,28	0,17	7,32		Quitobiase	0,21	0,23	5,88	
						Fosfatase ácida	0,35	0,27	6,89		β -glucosidase	0,28	0,27	5,72	
						FOX	0,63	0,61	6,37		Sulfatase	0,28	0,27	5,47	
Primavera											Protease	2,74	2,25	31,95	
											Desidrogenase	0,31	0,31	17,22	
											Fosfatase alcalina	0,26	0,10	10,56	
											FOX	0,14	0,09	8,52	
											β -glucosidase	0,17	0,27	7,23	
											Fosfatase ácida	0,27	0,36	6,77	
											Sulfatase	0,17	0,27	6,76	
											POX	0,61	0,61	6,63	19,45

4 Discussão e conclusão

Verificou-se que alguns dos resultados das tabelas do Kruskal-Wallis, baseados na análise da variância diferem dos resultados observados nos gráficos de barras, baseados na representação gráfica da média das réplicas com o respetivo erro padrão. Ao fazer a interpretação não deve-se esquecer que no teste Kruskal-Wallis não se pode afirmar que as amostras são as mesmas, caso as diferenças observadas não sejam significativas ($p\text{-value} < 0.05$). Sendo assim foi necessário executar análises estatísticas mais robustas e detalhadas, nomeadamente PCO, PERMANOVA e SIMPER para responder à hipótese colocada na presente dissertação.

Os resultados obtidos permitiram verificar que no rizosedimento de *S. maritima* existe maior conteúdo de matéria orgânica comparativamente com o rizosedimento de *S. versicolor*. Esta diferença está relacionada com os locais de colonização de cada espécie, *S. maritima* está presente na zona inferior do sapal com maior deposição de matéria orgânica e sedimento mais vasoso. Já a invasora *S. versicolor* a sua distribuição ocorre na zona superior e o sedimento de granulometria mais arenosa e com menor quantidade de matéria orgânica. Segundo Gorden *et al.* (1995) quanto maior a disponibilidade de matéria orgânica, maior será a atividade enzimática. Os resultados obtidos são similares aos resultados obtidos por Duarte, Reboreda e Caçador (2008), a atividade das enzimas exhibe variação temporal apresentando picos de atividade ao longo dos períodos analisados e conseqüentemente variações na degradação da matéria orgânica e dos seus subprodutos até à fase mineral.

A ordenação das amostras mostrou a separação das duas espécies relativamente à atividade enzimática. Esta diferença resulta também da influência dos fatores ambientais, nomeadamente pH, LOI, humidade relativa e salinidade. Os fatores ambientais influenciam a atividade dos seres vivos e a atividade das suas enzimas e identificou-se variações entre os locais que *S. maritima* e *S. versicolor* colonizam e entre períodos de amostragem. Os exsudados libertados pelas raízes das plantas resultam de diferentes necessidades nutricionais de cada espécie (Hines *et al.*, 1999) e estas podem modificar a função dos microrganismos da rizosfera e conseqüentemente a atividade das enzimas extracelulares (Reboreda e Caçador, 2008). Estas diferentes necessidades levam a um recrutamento distinto de microrganismos decompositores da matéria orgânica e conseqüentemente a atividades enzimáticas diferentes. Segundo Caravaca *et al.* (2005) estas variações podem ser explicadas por variações na biomassa de microrganismos ou diferenças nas suas comunidades associados ao rizosedimento. Verificou-se que existem distinções na atividade enzimática o que permite concluir que há diferenças na abundância e composição de microrganismos na rizosfera de cada uma das espécies de *Spartina*. Se as atividades enzimáticas são distintas, é provável que a abundância e composição também o seja, indicando que os seus exsudados são diferentes (Hines *et al.*, 1999). Sabe-se que na presença de

maiores quantidades de matéria orgânica, a atividade enzimática é mais elevada, refletindo grandes comunidades (Jordan *et al.*, 1995).

A existência de diferenças significativas nas comunidades de microrganismos presentes na rizosfera das duas espécies varia expressivamente em todos os períodos temporais, com exceção no Outono. Este resultado pode ser explicado pela maior inatividade das enzimas durante este período, pois os fatores ambientais, como por exemplo o pH não são tão favoráveis. As enzimas protease e POX são as que têm maior contribuição para a semelhança entre espécies e para os 4 períodos temporais. As enzimas FOX e POX intervêm juntas em funções de degradação da lenhina, processos de humificação e exportação do carbono dissolvido, sendo que a sua atividade aumenta com o pH (Sinsabaugh, 2010). Os resultados mostram que a atividade da enzima fenol oxidase é muito baixa no rizosedimento de *S. versicolor* e coincide com um menor valor de pH comparativamente com *S. maritima*. A sua atividade é muito geral na decomposição da matéria orgânica e permite que outras enzimas tenham acesso aos compostos mais simples, necessários para os microrganismos do solo e mineralização dos elementos orgânicos para a obtenção de nutrientes, necessários para as plantas. Sendo assim é de esperar que surjam nos resultados com um maior relevância e estejam sempre presentes em todos os períodos de amostragem. A dissimilaridade surge com uma percentagem reduzida, indicando que essa diferença entre espécies não é muito expressiva. Era de esperar pois as duas espécies de plantas pertencem ao mesmo género. As enzimas com maior contribuição foram a protease, desidrogenase, fosfatase alcalina e FOX. Estes resultados indicam diferenças na maneira como a matéria orgânica é decomposta e que a abundância de microrganismos é diferente nos dois tipos de rizosedimento amostrados.

A β -glucosidase esteve mais ativa em *S. versicolor*, precisamente onde há menos disponibilidade de matéria orgânica. Esta informação poderá indicar que existem um ou mais fatores que estão a limitar a atividade enzimática da β -glucosidase. Esta enzima está envolvida no ciclo do carbono, que serve de base ao crescimento das plantas. Aquando da recolha das amostras verificou-se que a *S. versicolor* era mais abundante, apresentando uma área de distribuição maior e as plantas em si eram mais altas e desenvolvidas comparativamente com *S. maritima*. A β -glucosidase é um indicador dos níveis de matéria orgânica. Não se verificou neste trabalho essa correlação. Welc *et al.* (2014) verificou que o pH está correlacionado de forma significativa com a atividade enzimática do solo, exceto para a sulfatase. Está correlacionado positivamente e fortemente com a atividade da β -glucosidase e quitobiase. No presente trabalho verificou-se a existência de correlação entre as enzimas FOX (0.349), β -glucosidase (-0.421), sulfatase (-0.444), quitobiase (-0.494) e o pH (anexo II), no entanto esta não foi muito expressiva possivelmente devido à dinâmica do ecossistema sapal.

Podemos inferir a partir dos resultados obtidos que espécies diferentes, mesmo pertencendo ao mesmo género, provocam diferentes alterações na função ecológica dos microrganismos do

rizosedimento e a forma como estes intervêm nos vários ciclos enumerados por Reboreda e Caçador (2008). Do ponto de vista da conservação será interessante analisar com mais detalhe este impacto nos ciclos biogeoquímicos para que as entidades decidam corretamente se deve haver controlo da espécie invasora *S. versicolor*.

A matéria orgânica influencia a atividade enzimática e a quantidade de água armazenada no sedimento. A atividade da maioria das enzimas extracelulares aumenta com o aumento do conteúdo em matéria orgânica no solo. Isto acontece porque as enzimas extracelulares analisadas neste trabalho intervêm na degradação da matéria orgânica, sendo igualmente a fonte de energia para as comunidades de microrganismos do solo. Sendo assim, o aumento dos níveis de MO leva à formação de comunidades maiores de microrganismos e conseqüentemente à síntese e libertação para o solo de mais enzimas. Este aumento de atividade leva ao maior processamento da matéria orgânica e à formação de mais materiais húmicos, que por sua vez contribuem para a estabilização das enzimas extracelulares (Gorden *et al.*, 1995). A atividade da β -glucosidase é influenciada diretamente pela matéria orgânica sendo por essa razão usada como indicador (Messina *et al.*, 2010). No entanto, neste estudo verificou-se que na presença de maiores quantidades de matéria orgânica, a atividade da β -glucosidase e sulfatase é mais baixa e na presença de menores quantidades a atividade das duas enzimas é superior. Esta observação pode dever-se a uma inibição das atividades destas duas enzimas ou a planta não necessitar destes compostos (carbono e enxofre) encontrando-se disponíveis no solo ou simplesmente existe um ou mais fatores ambientais a limitar a sua atividade. Um desses fatores limitantes é o pH do rizosedimento. Verificou-se, na primavera e no outono para a protease, que quando o seu valor é mais baixo a atividade enzimática diminui, mesmo na presença de matéria orgânica. Além do pH também se confirmou que a matéria orgânica mais uma vez influenciou a atividade enzimática, nomeadamente nos períodos e enzimas enumerados. A atividade da quitobiase não sofre influência da matéria orgânica. Já a sulfatase alcalina em *S. versicolor* segue o padrão de disponibilidade de matéria orgânica, tendo uma correlação positiva. A atividade enzimática não é só afetada pela MO. Após análise dos resultados verificou-se a influência por outras variáveis. Outro fator que afeta a atividade é a salinidade. Quando o valor de salinidade diminuiu (ex: primavera) verificou-se um aumento da atividade enzimática no rizosedimento de *S. maritima*. A salinidade, a MO e o pH são assim 3 fatores de grande influência na atividade enzimática e responsáveis pelas variações detetadas. Pode-se concluir ainda que além das variações das comunidades de microrganismos induzidas por cada espécie de planta, nomeadamente pela variação da composição dos exsudados libertados pelas duas raízes, as diferenças temporais das atividades enzimáticas obtidas nos resultados, resultam da variação dos fatores ambientais enumerados.

As hipóteses deste trabalho foram confirmadas. Existem diferenças significativas na atividade enzimática entre as duas espécies em estudo, nomeadamente nas atividades das enzimas fenol oxidase, β -glucosidase, fosfatase alcalina, quitobiase, sulfatase e desidrogenase. Sendo assim, esta análise foi muito importante para identificar indiretamente variações nas comunidades de microrganismos tendo em conta o fator espécie. Foi possível identificar uma relação entre a espécie vegetal, os seus exsudados e as comunidades de microrganismos da rizosfera. Sendo os microrganismos uma fonte de alimento para a meiofauna e estando estes integrados na sua cadeia trófica seria muito interessante a integração deste grupo num estudo posterior, permitindo assim o estudo da relação planta e os seus exsudados, as comunidades de microrganismos e a meiofauna. Seria igualmente interessante em estudos futuros considerar outras variáveis ambientais como por exemplo a temperatura e granulometria, uma vez que a variável temperatura tem influência na forma como a matéria orgânica é processada e consequentemente nas comunidades microbianas e as enzimas libertadas na rizosfera.

5 Bibliografía

- Acosta-Martínez, V.; Cruz, L.; Sotomayor-Ramírez, D.; & Pérez-Alegria, L. (2007). Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. *Applied Ecology* 35: 35-45
- Barkworth, M. (2003) *Spartina* Schreb. In Barkworth, M.; Capels, K.; Long, S. & Piep, M. (Eds.). *Flora of North America north of Mexico*, Oxford Press 25: 240-250
- Beetle, A. (1977). Noteworthy grasses from Mexico V. *Phytologia* 37: 317-407
- Bending, G. D.; Turner, M. K. & Jones, J. E. (2002). *Soil Biology & Biochemistry* 34: 1073-1082 in Stege *et al.*, 2010
- Berg, G. & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 68:1-13
- 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
- Burns, R. G. (1982). Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 14: 423-427
- Caravaca, F.; Alguacila, M. M.; Torres, P. & Roldán, A. (2005). Plant type mediates rhizospheric microbial activities and soil aggregation in a semiarid Mediterranean salt marsh. *Geoderma* 124: 375-382
- Castillo, J. M.; Fernandez-Baco, L.; Castellanos, E. M.; Luque, C. J.; Figueroa, M. E. & Davy, A. J. (2000). Lower limits of *Spartina densiflora* and *S. maritima* in Mediterranean salt march determined by different ecophysiological tolerances. *Journal of Ecology* 88: 801-812
- Ceccanti, B. & Garcia, C. (1994). Coupled chemical and biochemical methodologies to characterize a composting process and the humic substances. In Senesi, N. & Miano, T. (Eds.), *Humic substances in the global environment and implications on human health: proceedings of the 6th International Meeting of the International Humic Substances Society*. Elsevier, New York: 1279-1284
- Compeau, G. C. & Bartha, R. (1985). Sulfate-reducing bacteria principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied Environmental Microbiology* 50: 498-502
- 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

- DeForest, J. L.; Zak, D. R.; Pregitzer, K. S. & Burton, A. J. (2004). Atmospheric nitrate deposition and the microbial degradation of cellobiose and vanillin in a northern hardwood forest. *Soil biology & biochemistry* 36: 935-971
- Dudley, B. J., Gahnstrom, A. M. E. & Walker, D. J. (2001). The role of benthic vegetation as a sink for elevated inputs of ammonium and nitrate in a mesotrophic estuary. *Marine Ecology Progress Series*. 219: 99-107
- 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
- Duineveld, B. M.; Kowalchuk, G. A.; Keijzer, A.; van Elsas, J. D. & van Veen, J. A. (2001). Analysis of Bacterial Communities in the Rhizosphere of Chrysanthemum via Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified 16S rRNA as Well as DNA Fragments Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 1: 172-178
- Ekenler, M. & Tabatabai, M. A. (2002). B-glucosaminidase activity of soils: effects of cropping systems and its relationship to nitrogen mineralization. *Biology and Fertility of Soils* 36: 367-376
- Erwin, K. L. (2009). Wetlands and global climate changes: the role of wetland restoration in a changing world. *Wetlands Ecology and Management* 17: 71-84
- Ferrati, R.; Canziani, G. A. & Moreno, D. R. (2005). Esteros del Ibera: hydrometeorological and hydrological characterization. *Ecological modelling* 186: 3-15
- Friedel, J. K.; Mölter, K. & Ficher, W. R. (1994). Comparison and improvement of methods for determining soil dehydrogenase activity by using triphenyltetrazolium chloride and idonitrotetrazolium chloride. *Biology and fertility of soils* 4: 291-296
- Garbeva, P.; van Elsas, J. D. & van Veen, J. A. (2008). Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant soil* 302: 19-32
- García, C.; Hernández, M. T.; Albaladejo, J.; Castillo, V. & Roldán, A. (1998). Revegetation in semiarid zones: influence of terracing and organic refuse on microbial activity. *Soil Science Society of America Journal* 62: 670-676
- Gramss, G.; Ziegenhagen, D. & Sorge, S. (1999). Degradation of soil humic extract by wood- and soil-associated fungi, bacteria and commercial enzymes. *Microbial Ecology* 37: 140–151

- 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
- Hiltner, L. (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründung und Brache. *Arb Deutsch Landwirt Ges* 98: 59-78.
- 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
- 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
- Hojat, S. & Nourbakhsh, F. (2009). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 4: 179-186 in Stege *et al.*, 2010
- Jordan, D.; Kremer, R. J.; Bergfield, W. A.; Kim, K. W. & Cacnio, V. N. (1995). *Biology and Fertility of Soils* 19: 297-302 in Stege *et al.*, 2010
- Kandeler, E. (1996) in: Schinner, F.; Öhlinger, R.; Kandeler, E. & Margesin, R. (eds). Springer, Berlin
- 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
- LaRoque, J. R.; Bergholz, P. W.; Bagwell, C. E. & Lovell, C. R. (2004). Influence of host derived and abiotic environmental parameters on the composition of the diazotroph assemblage associated with roots of *Juncus roemerianus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 249-261
- Liogier, A. & Martorell, L. (2000). *Flora of Puerto Rico and adjacent islands: a systematic synopsis*. Universidad de Puerto Rico.
- Lugtenberg, B. J. J.; Chin-A-Woeng, T. F. C. & Bloemberg, G. V. (2002). *Microbe plant-interactions: principles and mechanisms*. *Antonie van Leewenhoek* 81: 373-383
- Marchant C. J. & Goodman P. J. (1969). *Spartina maritima* (Curtis) Fernald. *Journal of Ecology* 57: 287–291

- Masai, E. & Katayama, Y. (2007). Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Bioscience biotechnology and biochemistry* 71: 1-15
- Masciandaro, G. & Ceccanti, B. (1999). *Soil & Tillage Research* 51: 129-137 in Stege *et al.*, 2010
- Mobberley, D. G. (1956). Taxonomy and distribution of the genus *Spartina*. *Iowa State College Journal of Science* 30: 471-574
- Nannipieri, P. (1994). The potential use of enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In Pankhurst, C. E.; Doube, B. M.; Gupta, V. V. S. R. & Grace, P. R. (Eds.). *Soil Biota: Management in sustainability farming systems*. Csiro, Australia: 238-244
- Parham, J. A. & Deng, S. P. (2000). Detection, quantification and characterization of β -glucosaminidase activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1183-1190
- Peterson, P. (2001). *Spartina* Schreb. In Peterson, P.; Soreng, R.; Zuloaga, F. & Judziewicz, E. (Eds.). *Catalogue of new world grasses (Poaceae): II subfamily chloridoideae*. United States National Herbarium 41: 195-200
- Reboreda, R & Caçador, I. (2008). Enzymatic activity in the rhizosphere of *Spartina maritima*: Potential contribution for phytoremediation of metals. *Marine environment research* 65: 77-84
- Roldán, A.; García-Orenes, F. & Lax, A. (1994). An incubation experiment to determine factors involving aggregation changes in an arid soil receiving urban refuse. *Soil Biology & Biochemistry* 26: 1699-1707
- Schaefer, M. (1990). The soil fauna of a beech forest on limestone: trophic structure and energy budget. *Oecologia* 82: 128-136
- Schlesinger, W. H. (1991). *Biogeochemistry: An analysis of global change*. First edition. Academic Press Limited, London.
- Silva, K. R. A.; Salles, J. F.; Seldin, L. & van Elsas, J. D. (2003). Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. *Journal of Microbiological Methods* 54: 213-231
- Sinsabaugh, R. L. (2010). Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 391-404
- Smith, S. V. & Hollibaugh, J. T. (1993). Coastal metabolism and oceanic organic carbon balance. *Geophysical*. 31: 75-89

Stege, P. W.; Messina, G. A.; Bianchi, G.; Olsina, R. A. & Raba, J. (2010). Determination of β -glucosidase activity in soils with a bioanalytical sensor modified with multiwalled carbon nanotubes. *Analytical and bioanalytical chemistry* 3: 1347-1353

Swift, M. J.; Heal, O. W. & Anderson, J. M. (1979). *Decomposition in terrestrial ecosystems*. University of California Press. Berkeley

Tabatabai, M. A. (1994). In: Weaver, R. W.; Angle, J. S.; Botomley, P. S. (eds) *ASA*, Madisan

Teixeira, A.; Duarte, B. & Caçador, I (2014). Salt Marshes and Biodiversity. *Springer, Tasks for Vegetation Science* 47: 283-298

Thalman, A. (1968). Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch Forsch* 21: 249-258

Titus, J. G.; Park, R. A.; Leatherman, S. P.; Weggel, J. R.; Greene, M. S., Mausel, P. W.; Brown, S.; Gaunt, G.; Trehan, M. & Yohe, G. (1991). Greenhouse effect and sea level rise: the cost of holding back the sea. *Coast Manage* 19: 171–204

Treseder, K. K. (2008). Nitrogen additions and microbial biomass: a meta-analysis of ecosystem studies. *Ecology letters* 11: 1111-1120

Tscherko, D.; Hammesfahr, U.; Zeltner, G; Kandeler, E. & BÖcker, R. (2005). Plant succession and rhizosphere microbial communities in a recently deglaciated alpine terrain. *Basic and applied ecology* 6: 367-383

van Veen, J. A.; van Overbeek, L. S. & van Elsas, J. D. (1997). Fate and Activity of Microorganisms Introduced into Soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2: 121-135

Weller, D.M. (1988). Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Phytopathology* 26: 379-407

WCSP (2012). *Spartina versicolor* Fabre. Available: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-443835>. Last accessed 20 Maio 2014.

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

8. Anexos

8.1 Anexo I - Análise SIMPER, similaridade

Tabela 10 – Análise SIMPER, similaridade SV e SM

Espécie	Enzima	Abundância média	Contribuição (%)	Similaridade média
SV	Protease	2,46	55,39	85,37
	POX	0,59	13,05	
	Urease	0,30	7,65	
	Fosfatase ácida	0,33	6,51	
	Sulfatase	0,26	4,72	
	β -glucosidase	0,26	4,67	
SM	Protease	2,24	48,89	85,39
	POX	0,60	13,20	
	Desidrogenase	0,49	9,20	
	Urease	0,30	7,45	
	Fosfatase ácida	0,31	7,00	
	Sulfatase	0,21	4,59	

Tabela 11 – Análise SIMPER, similaridade temporal com a respetiva similaridade média

	Enzimas	Abundância média	Similaridade temporal		Similaridade média
			Contribuição (%)	Contribuição acumulada (%)	
Outono	Protease	2,32	57,67	57,67	84,76
	POX	0,54	12,63	70,30	
	Urease	0,30	8,36	78,66	
	Fosfatase ácida	0,30	7,53	86,19	
	Sulfatase	0,22	5,16	91,35	
Inverno	Protease	2,08	48,01	48,1	82,08
	POX	0,63	14,88	62,89	
	Urease	0,30	7,85	70,74	
	Fosfatase ácida	0,35	7,81	78,54	
	Sulfatase	0,28	5,71	84,26	
	β -glucosidase	0,28	5,71	89,96	
	Quitobiase	0,21	5,71	93,67	
Primavera	Protease	2,74	61,49	61,49	83,28
	POX	0,61	12,53	74,02	
	Urease	0,30	7,14	81,16	
	Fosfatase ácida	0,27	4,38	85,54	
	Fosfatase alcalina	0,26	4,06	89,60	
	Quitobiase	0,16	2,73	92,33	
Verão	Protease	2,74	49,57	49,57	84,33
	POX	0,61	13,53	63,10	
	Fosfatase ácida	0,30	8,23	71,33	
	Urease	0,27	7,54	78,87	
	β -glucosidase	0,26	5,98	84,85	
	Sulfatase	0,16	5,87	90,72	

8.2 Anexo II - Correlações

Tabela 12 – Coeficiente de correlação entre as variáveis ambientais e as atividades enzimáticas (N= 40).
Apenas correlações significativas.

Fator ambiental	Enzima	Spearman (ρ)
pH	Fenol oxidase	0,349*
	β -glucosidase	-0,421**
	Sulfatase	-0,444**
	Quitobiase	-0,494**
Salinidade	Fenol oxidase	0,330**
	β -glucosidase	-0,498**
	Fosfatase alcalina	-0,490**
	Sulfatase	-0,477**
	Desidrogenase	0,644**
	Protease	-0,356*
MO	Fenol oxidase	0,436**
	β -glucosidase	-0,361*
	Sulfatase	-0,387*
	Desidrogenase	0,544**
HR	Fenol oxidase	0,378*
	Sulfatase	0,346*
	Desidrogenase	0,467**

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$