

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos**  
**Trópicos**

**ALDECI FRANÇA ARAUJO DOS SANTOS**

**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADAS AO SEDIMENTO DE MANGUEZAL  
DA BARRA DE SANTO ANTÔNIO, ALAGOAS, BRASIL**

**MACEIÓ - ALAGOAS**  
**Outubro/2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos**  
**Trópicos**

**ALDECI FRANÇA ARAUJO DOS SANTOS**

**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADAS AO SEDIMENTO DE MANGUEZAL  
DA BARRA DE SANTO ANTÔNIO, ALAGOAS, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, na área de Conservação da Biodiversidade Tropical.

**Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Melissa Fontes Landell**

**MACEIÓ - ALAGOAS**  
**Outubro/2022**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

S237d Santos, Aldeci França Araujo dos.

Diversidade de leveduras associadas ao sedimento de manguezal da Barra de Santo Antônio, Alagoas, Brasil / Aldeci França Araujo dos Santos. – 2022.

77 f. : il. color.

Orientadora: Melissa Fontes Landell.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos. Maceió, 2022.

Inclui bibliografias.

1. Manguezal. 2. Microrganismos. 3. Leveduras. I. Título.

CDU: 582.282.23 : 633.876

***À minha filha Maria Cecília***  
***Dedico***

## **Agradecimentos**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida e ter me dado forças para continuar nessa caminhada em busca de um futuro melhor. Sem a minha fé não teria conseguido persistir no mestrado diante da perda dos meus familiares que morreram contaminados pelo vírus da Covid-19.

À minha família por ter me dado forças, amor, esperança, e apoio incondicional para superar todos os obstáculos.

Agradeço aos meus pais pelo incentivo, ao meu pai, Valmir, herói e inspiração, por investir no meu futuro trabalhando de “sol a sol” como pedreiro para me oportunizar a melhor educação possível. Muitas vezes me levava para assistir “rachas” de futebol e compartilhava comigo a sua paixão por jogos. Por vezes, muito tímido, meu pai ficava envergonhado quando eu o abraçava e demonstrava carinho, em especial nos dias em que ele chegava de viagem. Sou orgulhosa de tê-lo como exemplo de perseverança e otimismo.

À minha mãe, Claudeci, por sua alegria de viver e por enxergar o lado bom de todas as coisas. Sempre muito orgulhosa de suas filhas, uma enfermeira e uma “professorinha”. Diferente do meu pai, minha mãe adora dizer que nos ama e demonstra afeto em todos os lugares.

À minha irmã, Valdilene, por ser meu porto seguro muitas vezes e vice-versa, com ela me sinto bem para conversar sobre as diversas coisas da vida. Às vezes ela parece ser a irmã mais nova.

Ao meu marido, Júnior, por estar sempre ao meu lado com todo carinho, atenção, compreensão, amizade, incentivo e que muitas vezes compartilha comigo de partes de seus sonhos para me incentivar a trilhar nesse caminho, dedico.

À minha filha, Maria Cecília, a luz da minha vida. Razão pela qual todos os dias eu ainda insisto na busca por um futuro melhor. Você filha, é o meu presente inesperado mais amado do mundo. Em você encontrei calma, paz e esperança. Com você tudo fica mais “leve” e feliz.

À minha orientadora, Professora Doutora Melissa Fontes Landell pelo suporte, por ter me dado oportunidades impensadas, atenção, dedicação no tempo que lhe coube, pelas suas correções, orientações e incentivos. Por me apoiar e me disciplinar quando preciso, assim como uma mãe faz com seus filhos, você me tomou em seus “braços” e me acolheu em meio ao turbilhão de emoções e desafios da pós-graduação e da vida. Agradeço por Deus ter colocado a senhora na minha vida, e agradeço imensamente por “apostar” no meu futuro e espero ter honrado essa escolha.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Diversidade Molecular (LDM) Ciro, Gustavo, Maurício, Vitória, Victor, Bruno e Júlio que sempre colaboraram e me apoiaram no desenvolvimento da pesquisa. Somos bastante unidos em prol da consolidação de um aprendizado mútuo nos tornamos uma família que visa sempre o melhor nos apoiando nas escolhas e na vida.

À todos os meus Professores Mestres e Doutores que contribuíram e os que continuam contribuindo para a minha formação.

Ao CNPq, FAPESP e Capes pela concessão da bolsa e financiamento que permitiu o andamento deste trabalho.

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse desenvolvido.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

## RESUMO

Os manguezais são ecossistemas de transição entre o ambiente marinho e terrestre, presentes em regiões tropicais e subtropicais. É considerado um dos mais importantes ecossistemas. Devido ao alto conteúdo orgânico dos solos e da rizosfera, é possível abrigar uma diversidade de microrganismos interagindo entre si, com outros organismos e com fatores ambientais. Vários estudos demonstraram associações entre bactérias e algumas espécies de plantas de mangue. No entanto, comunidades de leveduras associadas a espécies de mangue recebem muito menos atenção. Diante do exposto, nosso objetivo foi verificar a diversidade e a composição de leveduras associadas aos sedimentos adjacentes à rizosfera da espécie *L. racemosa* e avaliar se fatores bióticos e abióticos do ambiente podem influenciar a diversidade. Para tanto, foram aferidos os parâmetros físico-químicos e coletadas amostras de sedimento em três pontos no manguezal do rio Santo Antônio. As amostras foram diluídas e semeadas em Ágar YM modificado, seguidas de incubação a 25-28 °C por 5-7 dias. Para realizar a identificação molecular, a região D1/D2 LSU rDNA dos isolados foi amplificada e sequenciada. Os parâmetros físico-químicos do ambiente não apresentaram variação estatisticamente significativa entre os pontos. Foi obtido um total de 132 isolados de leveduras, pertencentes a 32 espécies distribuídas em 18 gêneros. A maioria das espécies teve ocorrência única nas amostras. Foi isolada uma possível espécie nova pertencente ao gênero *Barnettozyma*. Além disso, verificamos que a comunidade de leveduras dos pontos amostrados é composicionalmente estável, mas as diversidades taxonômicas e filogenéticas entre os pontos amostrados tiveram diferenças significativas, aumentado à medida que os locais de amostragens estavam mais distantes do mar. Estes resultados indicam que, apesar das flutuações diárias dos fatores do ambiente, há uma estabilidade na composição da comunidade de leveduras que vivem em associação com a espécie *L. racemosa*. A curva de extrapolação não atingiu a assíntota, indicando que ainda existem espécies de leveduras em associação com a espécie *L. racemosa* que não conseguimos amostrar. Através da análise dos dados obtidos, concluiu-se que os parâmetros físico-químicos aferidos não influenciaram a diversidade de leveduras amostradas. A diversidade taxonômica de leveduras na mesma espécie vegetal pode variar ao longo do manguezal e provavelmente devido ao regime de marés haverá um ciclo de entrada e saída de espécies. Portanto, novas coletas devem ser feitas para melhor elucidar a dinâmica das espécies de leveduras presentes em manguezal.

Palavras-chave: Micro-organismos, fungos, rizosfera, APA Costa dos Corais, floresta de mangue

## ABSTRACT

Mangroves are transitional ecosystems between marine and terrestrial environments present in tropical and subtropical regions. It is considered the most important ecosystem. Due to the fact that the high organic content of soils and rhizosphere enables it to encompass a diversity of microorganisms interacting with each other, with other organisms and also with environmental factors. Several studies have demonstrated associations between bacteria and some species of mangrove plants. However, yeast communities associated with mangrove species receive much less attention. Thus, our objective was to verify the diversity and composition of yeasts associated with sediments adjacent to the rhizosphere of the *L. racemosa* species and to assess whether biotic and abiotic factors in the environment can influence diversity. Therefore the physical-chemical parameters were measured and sediment samples were collected at three different points in the mangrove swamp of the Santo Antônio river. Samples were diluted and seeded on modified YM Agar, followed by incubation at 25-28 °C for 5-7 days. To perform molecular identification the D1/D2 LSU rDNA region of the isolates was amplified and sequenced. The physical-chemical parameters of the environment did not show significant variation statistically between the points. A total of 132 isolated were obtained belonging to 32 species distributed in 18 genera. Most species had a single occurrence in the samples and a possible new species belonging to the genus *Barnettozyma* was isolated. Furthermore, we verified that the yeast community of the sampled points is compositionally stable, but the taxonomic and phylogenetic diversities between the sampled points had significant differences increasing as the sampling sites were farther from the sea. These results indicate that, despite the daily fluctuations of environmental factors, there is stability in the composition of the community of yeasts which live in association with the species *L. racemosa*. The extrapolation curve did not reach the asymptote, indicating that there are still yeast species in association with the *L. racemosa* species which we were unable to sample. Through the analysis of the data obtained, it was concluded that the physical-chemical parameters measured did not influence the diversity of sampled yeasts. The taxonomic diversity of yeasts in the same plant species can vary throughout the mangrove and probably due to the tidal regime there will be a cycle of entry and exit of species. Therefore, new collections must be made to better elucidate the dynamics of yeast species present in mangroves.

Keywords: Microorganisms, fungi, rhizosphere, APA Costa dos Corais, mangrove forest.

## Sumário

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                                            | 11 |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                                                             | 14 |
| 2.1. Objetivo geral                                                                                             | 14 |
| 2.2. Objetivos específicos                                                                                      | 14 |
| <b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>                                                                                 | 15 |
| 3.1. O ecossistema manguezal                                                                                    | 15 |
| 3.2. Os manguezais brasileiros                                                                                  | 17 |
| 3.3. Cobertura vegetal                                                                                          | 18 |
| 3.4. Sedimento de manguezais                                                                                    | 20 |
| 3.5. Micro-organismos associados a sedimentos adjacentes à rizosfera de mangues                                 | 21 |
| 3.6. Leveduras                                                                                                  | 23 |
| <b>4. METODOLOGIA</b>                                                                                           | 25 |
| 4.1. Área de estudo                                                                                             | 25 |
| 4.2. Coleta e delineamento amostral                                                                             | 25 |
| 4.3. Análises da água                                                                                           | 27 |
| 4.3.1. Parâmetros físico-químicos                                                                               | 27 |
| 4.3.2. Parâmetros microbiológicos                                                                               | 27 |
| 4.4. Análises do sedimento                                                                                      | 28 |
| 4.4.1. Parâmetros físico-químicos                                                                               | 28 |
| 4.4.2. Parâmetros microbiológicos                                                                               | 28 |
| 4.5. Comunidade de leveduras                                                                                    | 28 |
| 4.5.1. Processamento das amostras, isolamento e conservação das leveduras                                       | 28 |
| 4.5.2. Classificação morfológica das leveduras                                                                  | 29 |
| 4.6. Análises estatísticas                                                                                      | 30 |
| 4.6.1. Análise de diversidade de leveduras e influência fatores do ambiente                                     | 30 |
| <b>5. MANUSCRITO</b>                                                                                            | 32 |
| <b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                | 60 |
| 6.1. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos do sedimento e da água do Manguezal da Barra de Santo Antônio | 60 |
| 6.2. Riqueza e diversidade de leveduras                                                                         | 63 |

|                                                        |           |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| 6.3. Abundância das espécies de Levedura isoladas..... | 65        |
| 6.4. Índices de diversidade .....                      | 67        |
| <b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>                   | <b>69</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                | <b>71</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais (APACC) faz parte da Unidade de Conservação Federal do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e possui aproximadamente 120 km de manguezais e faixa litorânea de praia. Um dos principais objetivos da APACC é viabilizar a proteção dos manguezais presentes nos trechos centro-oeste e norte do litoral de Alagoas, mantendo a integridade desse ecossistema. Entre os manguezais existentes na APACC está o manguezal do rio Santo Antônio (ICMBio/APACC, 2013; APACC/ PAPP, 2018).

Os manguezais são ecossistemas costeiros, complexos, sujeitos ao regime de marés (TOMLINSON, 1986; BEHERA *et al.*, 2017), e estão situados em áreas de transição entre os ambientes terrestres e marinhos de regiões tropicais e subtropicais (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995; KATHIRESAN; BINGHAM, 2001). Esse ecossistema tem habitats variados, responsáveis por abrigar diversos organismos que interagem entre si, como espécies animais e vegetais denominadas mangue (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995; ICMBIO, 2018).

No litoral brasileiro predominam três gêneros vegetais de mangue: *Avicennia*, *Laguncularia* e *Rhizophora*. As plantas dos três gêneros são halófitas restritas a manguezais que desenvolveram adaptações fisiológicas para sobreviver em solos extremamente salinos, com temperaturas muito elevadas e deficiência de oxigênio em virtude das alterações da maré (TOMLINSON, 2016). A espécie *Laguncularia racemosa*, por exemplo, é encontrada predominantemente em águas salobras, no fragmento intermediário do sedimento de manguezais, ou seja, em lugares pouco alagado (SCHAEFFER-NOVELLI; CITRON-MOLERO, 1986). Além disso, os indivíduos dessa espécie são amplamente distribuídos por toda costa brasileira (Ximenes *et al.*, 2016).

Como exemplos de adaptações das espécies vegetais presentes em manguezais têm-se a viviparidade (processo em que ocorre a germinação e desenvolvimento precoce das sementes antes da dispersão), a criação de mecanismos de excreção de sal (glândulas de sal), e o desenvolvimento de pneumatóforos ou rizóforos, que se

fixam ao substrato lamoso criando zonas com atividade biológica elevada (OSÓRIO; WINGFIELD; ROUX, 2016).

Essas zonas são criadas devido ao processo intitulado de facilitação, que ocorre no ecossistema entre as plantas e os diversos organismos (HUXHAM *et al.*, 2019). Os micro-organismos que habitam os sedimentos adjacentes à rizosfera de manguezais possuem alta adaptabilidade, fertilidade e diversidade genética (SINGH; SINGH; PANDA, 2020), entre esses estão os fungos e as bactérias (JIA *et al.*, 2020).

Apesar dos diversos fatores, alguns micro-organismos prosperam nesse tipo de ecossistema, como as leveduras. Leveduras são fungos unicelulares que se distribuem em ambientes atmosféricos, aquáticos e terrestres (BUZZINI; LACHANCE; YURKOV, 2017). Em sedimentos de mangue, ambiente rico em matéria orgânica, são encontradas em pequenas profundidades (MASON *et al.*, 2014), compondo uma boa parte da biomassa microbiana (BUZZINI; LACHANCE; YURKOV, 2017). Esse grupo de micro-organismos desempenham papéis fundamentais no ecossistema, como a decomposição de matéria orgânica, são bioindicadores ambientais, realizam a ciclagem de nutrientes e mantêm uma relação simbiótica com as plantas e suas raízes (CHI *et al.*, 2012; KUNTHIPHUN *et al.*, 2019).

Com o passar dos tempos uma diversidade de leveduras foram isoladas de sedimentos (YURKOV, 2017). Na literatura foram relatadas algumas informações sobre espécies de leveduras que podem ser influenciadas por fatores do ambiente (KRUMME *et al.*, 2012, LIU *et al.*, 2020; SARAVANAKUMAR *et al.*, 2016), entretanto ainda são poucos os estudos que relatam sobre as espécies de leveduras (BUZZINI; LACHANCE; YURKOV, 2017). As leveduras provenientes de sedimentos de ecossistemas tropicais e subtropicais, por exemplo, recebem menos atenção que as demais, e aos poucos estão sendo devastadas, portanto pesquisas que investigam a comunidade de leveduras desses ambientes são valiosas (YURKOV, 2018).

Nesse contexto, é importante conhecer as espécies de leveduras presentes em sedimentos adjacentes à rizosfera, pois a presença ou ausência de algumas destas espécies nos ecossistemas podem estar diretamente relacionadas a alterações no ambiente, como poluição e degradação (FELL *et al.*, 2010; ARAUJO; HAGLER, 2011). A espécie *Kluyveromyces aestuarii* é recorrente em manguezais e a sua ausência pode indicar modificações ambientais de origem natural, como inundação provocada pela abundância de chuvas, ou modificações de origem antrópica, como a poluição

proveniente de resíduos derivados de alvenaria (ARAUJO; HAGLER, 2011). As espécies *Candida tropicalis* e *Candida albicans*, por exemplo, são espécies de leveduras que segundo Fell e colaboradores (2010) são encontradas em ambientes com indícios de poluição.

Em manguezais, os fungos filamentosos e as bactérias são mais pesquisados se comparados às leveduras (LOUREIRO *et al.*, 2011; JIA *et al.*, 2020). Entretanto, mostram-se promissores em relação à diversidade de leveduras e quando estudados, revelam além de uma alta diversidade, a presença de novas espécies (SARAVANAKUMAR *et al.*, 2013; SIMÕES *et al.*, 2015; YAO *et al.*, 2018, ARMED *et al.*, 2019). Como no trabalho realizado por Fell e colaboradores (2004), onde foram estudados os sedimentos de manguezal nas Bahamas e verificaram a presença de uma nova espécie denominada *Lachancea meyersii*, e os estudos realizados por Kunthiphun e colaboradores (2019) e Limtong e colaboradores (2008) que ao estudar as florestas de mangue da Tailândia, verificaram a presença de novas espécies de leveduras, *Heterocephalacria mucosa*, e *Candida thaimueangensis*, respectivamente.

Estudos envolvendo a comunidade de leveduras em habitats ecótonos como os manguezais são negligenciados (SIMÕES *et al.*, 2015). Estudos sobre os micro-organismos associados são importantes para que se possa identificar a biodiversidade local e averiguar a composição dessas comunidades que sobrevivem em ecossistemas tão fisiologicamente desafiadores (FIORAVANTI *et al.*, 2012). Além disso, estudos sobre a comunidade de leveduras associadas a sedimentos adjacentes à rizosfera da espécie *L. racemosa* são inexistentes até o momento, sendo o nosso trabalho pioneiro. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a comunidade de leveduras associadas a sedimentos adjacentes à rizosfera da espécie de mangue *L. racemosa* no manguezal do município Barra de Santo Antônio, Alagoas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Verificar a diversidade e a composição de leveduras associadas aos sedimentos adjacentes à rizosfera da espécie *L. racemosa* e avaliar se fatores bióticos e abióticos do ambiente podem influenciar a diversidade.

### **2.2. Objetivos específicos**

Avaliar a comunidade de leveduras cultiváveis associadas aos sedimentos adjacentes à rizosfera das espécies de *L. racemosa* no manguezal do rio Santo Antônio, Alagoas;

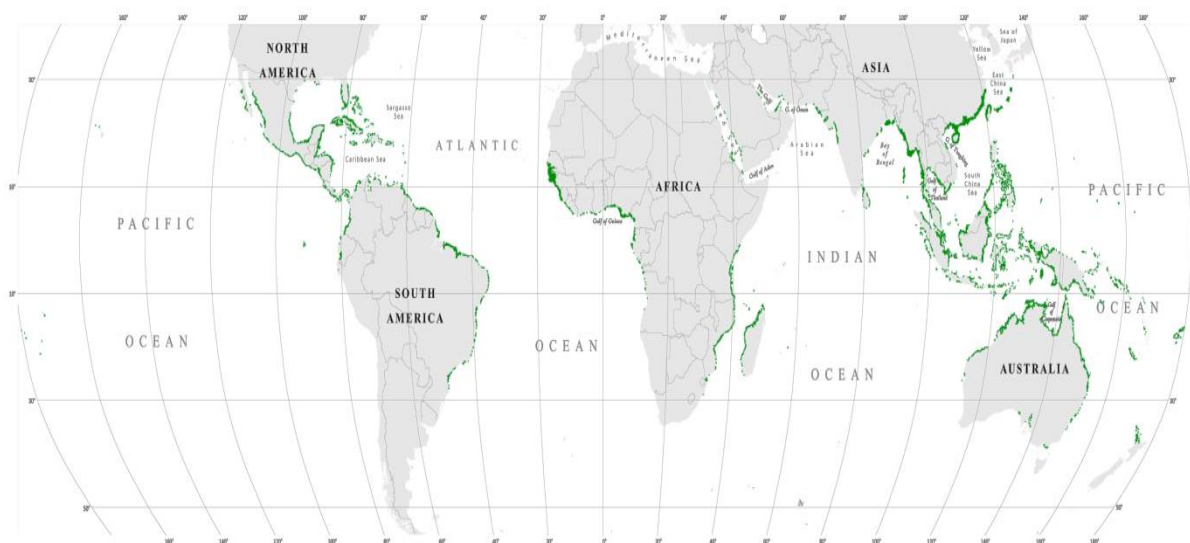
Verificar como a comunidade de leveduras responde a mudanças nos fatores ambientais.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. O ecossistema manguezal

Os manguezais são ecossistemas costeiros situados em regiões tropicais e subtropicais (Figura 1), ecótono entre a terra e a água (CAIAFA *et al.*, 2020). Com área de aproximadamente 150.000 km<sup>2</sup>, os manguezais abrangem um total de 123 países (KATHIRESAN, 2012), sendo que a maior extensão territorial de manguezais está localizada na Ásia, África, Oceania, América do Sul e América do Norte, representados respectivamente pela Indonésia, Nigéria, Austrália, Brasil, e México, totalizando uma parcela de 48% dos manguezais do mundo (UNEP, 2014).

**Figura 1.** Mapa mostrando distribuição dos manguezais no mundo



**Fonte:** (GIRI *et al.*, 2011)

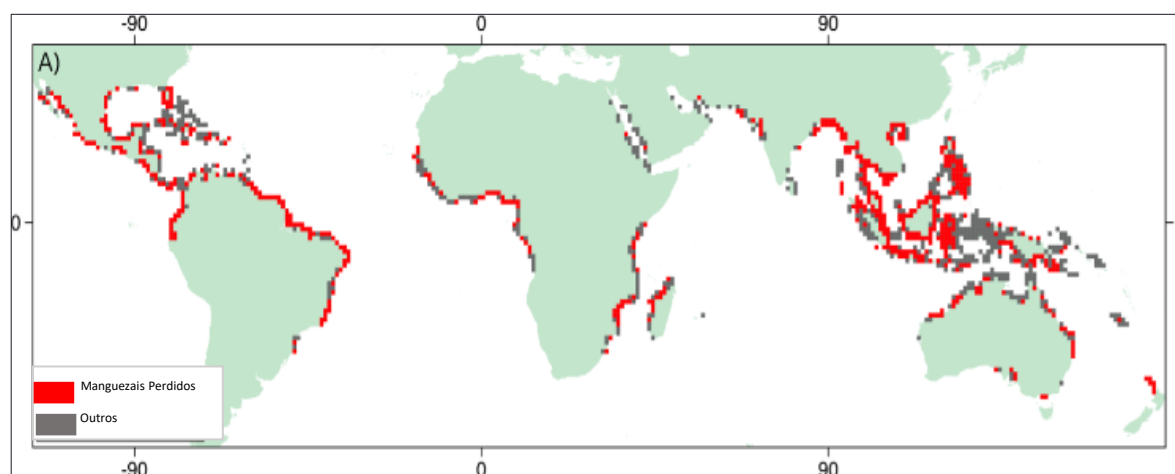
Os manguezais são ambientes singulares, pois possuem a capacidade de absorção de carbono atmosférico e armazenamento em forma de carboidratos (açúcares e celulose), tendo um papel importante no balanço mundial geral de carbono (SOUZA *et al.*, 2018). Além disso, esses ecossistemas são altamente produtivos (FERREIRA; LARCEDA, 2016) e dispõem de características físico-químicas únicas que variam de acordo com a alta e baixa da maré, sazonalidade com estação chuvosa e seca (SCHAEFFER-NOVELLI, 1990), ou até mesmo as ações antrópicas por meio de

despejos inadequados de esgoto doméstico, que influenciam na qualidade da água e do solo (PINHEIRO; TALAMONI, 2018).

As contribuições ambientais prestadas pelo ecossistema manguezal são diversas, como estabilização da costa, barreiras no processo de lixiviação e sequestram mais carbono que as demais florestas tropicais (HOCHARD *et al.*, 2019). Esse ecossistema possui nichos ecológicos diversificados responsáveis por abrigar diversos organismos numa escala macro ou microbiológica, como anfíbios, mamíferos, peixes, insetos, aves, crustáceos, moluscos, protozoários, fungos e bactérias (KUSUMANINGTYAS *et al.*, 2019) sendo que algumas dessas espécies não são restritas desse ecossistema, mas alimentam-se e se reproduzem nele, contabilizando aproximadamente 700 espécies (ICMBio, 2018).

Até 2001, estimou-se que os manguezais tenham sofrido taxas de desmatamento de aproximadamente 3,6% ao ano (VALIELA; BOWEN; YORK, 2001). No cenário atual, os índices anuais de desmatamento dos mangues variaram entre 0,2 e 0,7%. A redução dos índices de desmatamento está relacionada à implantação de práticas efetivas de conservação (FRIESS *et al.*, 2019), atreladas a práticas de monitoramento em larga escala (Figura 2) (MEJÍA-RENTERÍA *et al.*, 2018). Os estudos no ecossistema manguezal têm aumentado, mas ainda não contemplam informações suficientes para a implementação de práticas de conservação globais (FRIESS *et al.*, 2019).

**Figura 2.** Mapa demonstrando as áreas de manguezais perdidas



Fonte: Adaptado de (THOMAS *et al.*, 2017)

A perda, redução ou fragmentação dos manguezais afetam negativamente os serviços ecossistêmicos prestados por esse ecossistema e para as comunidades de organismos que habitam esse ambiente, como por exemplo, o sequestro de carbono (CURNICK *et al.*, 2019). Uma das alternativas para a recuperação dessas áreas é a prática de silvicultura de espécies de mangues, mas esse processo pode afetar e modificar o ambiente, perdendo a funcionalidade de abrigar os organismos nativos de manguezais (BRYAN-BROWN *et al.*, 2020).

### **3.2. Os manguezais brasileiros**

O Brasil ocupa o terceiro lugar no ranking mundial de países com maior área de manguezais, ficando atrás apenas da Indonésia e da Austrália, com 7% dos manguezais do mundo (FAO, 2007). Com área de aproximadamente 13.000 Km<sup>2</sup>, os manguezais brasileiros abrangem um vasto território que se estende desde a costa da Praia do Sonho, em Santa Catarina até o Oiapoque, no Estado do Amapá (ICMBio, 2018; GASPARINETTI *et al.*, 2018). A FAO (2007) estimou a cobertura de manguezais em 15,2 milhões de hectares, sendo as maiores áreas presentes na Ásia, África e América.

De acordo com o Código Florestal Brasileiro, através da lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012, os manguezais são Áreas de Preservação Permanente (APP) e seu uso está condicionado à normativas estabelecidas garantidas por lei que constam na Constituição Federal (1988), no Código Florestal (Lei 4.471/65), na Resolução nº 303/2002 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) e no Novo Código Florestal (Lei 12.651/2012).

Essas leis e resoluções determinam os usos sustentáveis dos recursos ecossistêmicos e das suas extensões, propondo medidas que viabilizem a conservação e o desenvolvimento econômico de forma igualitária. Para tanto, o conceito de Unidades de Conservação (UCs) foi criado e organizado junto ao Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC) para viabilizar a preservação e conservação da biodiversidade da fauna e da flora, atualmente em território nacional já existem 2.309 UCs estabelecidas e os manguezais estão presentes em 120 delas (LEÃO; PRATES; FUMI, 2018).

Os manguezais são ecossistemas complexos, neles existem condições físico-químicas variadas, alterações de temperatura, salinidade e inundação (SINGH; SINGH; PANDA, 2020), mas algumas alterações que ocorrem nos manguezais são decorrentes principalmente da ação antrópica, como desmatamento da área vegetativa para fins de especulações imobiliárias (construção de residências ou empreendimentos privados), para a inserção de novos empreendimentos de aquicultura (psicultura e carcinicultura), plantio de monoculturas (cana-de-açúcar, soja e coqueirais) e extrativismo ilegal (para obtenção de lenha) (ICMBio, 2018; GASPARINETTI *et al.*, 2018; CAIAFA *et al.*, 2020).

Esses distúrbios comprometem o processo de fotossíntese de algumas espécies mais sensíveis a essa alteração, que acarreta mudanças no período de floração, compromete a relação simbiótica de organismos polinizadores, ocorre o aumento da temperatura do ar e água, provoca a escassez pluviométrica que pode ocasionar o desaparecimento de algumas espécies termosensíveis e mudanças na distribuição e composição das comunidades (CAIAFA *et al.*, 2020).

### **3.3. Cobertura vegetal**

Os manguezais brasileiros possuem uma área de 1.211.44 hectares de cobertura vegetal e, dessa área, cerca de 83% são destinados ao uso sustentável, sendo que 17% são protegidas integralmente (ICMBio, 2019). Entre os estados brasileiros, o Maranhão possui a maior cobertura vegetal de mangue com aproximadamente 5.054 Km<sup>2</sup>, seguido por Amapá (2.268 Km<sup>2</sup>), Pará (3.905 Km<sup>2</sup>), com menores parcelas em Espírito Santo (80 Km<sup>2</sup>), Piauí (55 Km<sup>2</sup>) e Alagoas (55 Km<sup>2</sup>). Assim mesmo, estima-se que 25% dos manguezais foram devastados até o início do século 20, principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste (ICMBio, 2018). As principais espécies encontradas são: *A. germinans*, *A. schaueriana*, *L. racemosa*, *R. harrisonii*, *R. mangle* e *R. racemosa* (Figura 3) (GASPARINETTI, 2018).

**Figura 3.** Mapa da distribuição das espécies vegetais de mangue no litoral brasileiro.



Fonte: Adaptado de (Ximenes *et al.*, 2016)

O gênero *Rhizophora* é conhecido popularmente como mangue-vermelho, mangue-verdadeiro, mangue-bravo, entre outros. Ocorre principalmente às margens do rio nas parcelas mais submersas e próxima ao oceano, chegando a tolerar até 55 partes por milhão (ppm) de salinidade (SCHAEFFER-NOVELLI; LACERDA, 1994). As espécies desse gênero toleram menos salinidade do que as espécies do gênero *Avicennia*, conhecidas como mangue-preto, siribinha e siriúba (SCHAEFFER-NOVELLI; CITRON-MOLERO, 1986). Já as espécies do gênero *Laguncularia*, conhecidas como mangue-branco ou mangue-amarelo, são encontrados em regiões de costa com baixa salinidade, ou, ao longo de canais de água salobra (SCHAEFFER-NOVELLI; CITRON-MOLERO, 1986).

A estrutura das florestas de mangue possibilita a criação de habitats diversificados que proporcionam abrigo para as espécies contra os predadores,

possibilitam a reprodução e crescimento das espécies de origem oceânica, de água doce e terrestres, além de servirem para fins medicinais (SANTOS *et al.*, 2020). As condições ambientais como a incidência de luz, temperatura e os fatores edáficos são determinantes para a fauna dos manguezais (SILVA; MAIA, 2019).

### **3.4. Sedimento de manguezais**

Algumas variações físico-químicas do sedimento estão atreladas as espécies vegetativas, possibilitando uma relação intrínseca entre a saúde do solo e a nutrição das plantas, pois a estabilidade e os nutrientes do sedimento são fundamentais para os mangues e os demais organismos (LACERDA, 1984; VANNUCCI, 1989; NOVA *et al.*, 2017).

Os manguezais brasileiros estão firmados sob o solo com uma enorme variação granulométrica sedimentar de composição variada entre os tipos arenoso, argiloso e siltico (SILVA; MACEDO; BRAYNER, 2010). Para a análise de sedimentos, o CONAMA estabelece os “Valores de Referência de Qualidade do Solo (VRQ)” na Resolução 420/2009. Os VRQs são baseados na avaliação dos teores naturais dos elementos nos solos, sem influência da atividade humana (CONAMA, 2009) estabelecidos para cada estado do Brasil. A mesma resolução apresenta valores orientadores (VO) para elementos-traço que foram compilados de estudos ecotoxicológicos realizados fora do Brasil.

Quando é analisada a composição do sedimento e levando em consideração os VRQs, elevadas quantidades de silte e argila e menores teores de areia podem indicar a presença de contaminantes (CETESB, 2018). O monitoramento de eventuais entradas desses elementos pode garantir a preservação dos serviços ecossistêmicos (ALLOWAY, 1990; CAMPOS *et al.*, 2018).

Os sedimentos de manguezais são constituídos principalmente por resíduos do próprio ambiente, como a serapilheira proveniente de folhas, sementes e propágulos, organismos vertebrados e invertebrados e outros componentes decorrentes da periodicidade das inundações pelas águas oceânicas e água doce, recebendo nutrientes e sedimentos de rio e terras a jusante (FAO, 2007; KERRY; DAS; PATRA, 2017). Geralmente os sedimentos de manguezais apresentam aspecto de lama, alta salinidade, possui um cheiro semelhante a ovo em estágio de decomposição. Esse odor

é mais forte em alguns manguezais do que em outros devido a quantidade de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) (UNESP, 2018).

As características bioquímicas, biofísicas e biológicas do sedimento, como: a atividade enzimática, a taxa de respiração, a diversidade e a biomassa microbiana, são bioindicadores de qualidade ambiental sensíveis que fornecem informações importantes para conservação e manejo do ecossistema manguezal (SANTANA; BAHIA FILHO, 1998; DORAN; PARKIN, 1997).

Os sedimentos provenientes de manguezais possuem a natureza histórica local, pois possibilita o conhecimento de materiais sedimentados e de eventos que podem ter ocorrido durante anos ou até mesmo séculos, contendo informações de possíveis impactos sofridos por esse ambiente (BORGES, 2006). Li e colaboradores (2019) observaram que a contaminação em sedimentos de mangue pode ter um efeito negativo na capacidade de deposição de nutrientes realizada por micro-organismos no ecossistema. A degradação dos manguezais afeta também a diversidade e modifica as características físicas do ambiente (RODRIGUEZ *et al.*, 2019).

### **3.5. Micro-organismos associados a sedimentos adjacentes à rizosfera de mangues**

Os manguezais, por exemplo, são ecossistemas que possuem condições ambientais muito características e singulares, que são *hotspots* de diversidade de micro-organismos que desempenham papéis essenciais para a manutenção do ecossistema (ANDREOTE *et al.*, 2012), contribuindo para o *status* de alta produtividade dos manguezais (KOMIYAMA; ONG; POUNGPARN, 2008).

A biomassa microbiana nos manguezais é constituída principalmente por fungos e bactérias, que representam 91% da totalidade, e os demais 9% são constituídos por algas e os protozoários (ALONGI, 1988). Entre os serviços ecossistêmicos desempenhados pelos micro-organismos, os fungos contribuem para a decomposição primária de matéria orgânica, reciclando e conservando nutrientes neste ecossistema (DAS; LYLA; KHAN, 2006; KRISTENSEN *et al.*, 2008), participando também da cadeia alimentar como alimento de vertebrados e invertebrados (GHIZELINI; HAGLER; MACRAE, 2012).

Os micro-organismos, incluindo as leveduras, podem ser biorremediadores de ecossistemas fragilizados e/ou devastados (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010), uma vez que podem utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono (AMARAL; LACERDA; NAVONI, 2020). Além disso, são eficientes na biodegradação de compostos, tornando-se uma alternativa para recuperar efluentes contaminados por corantes industriais e por compostos xenobióticos, como óleos que frequentemente afetam os manguezais (FASANELLA *et al.*, 2012). Os fungos produzem metabólitos secundários que possibilitam a sua sobrevivência e adaptação às condições dos manguezais e auxilia na degradação de componentes vegetais (THATOI; BEHERA; MISHRA, 2013).

Ao entorno das raízes dos mangues há a presença de uma área denominada rizosfera, que segundo Mcnear Junior (2013), se refere às parcelas de sedimentos próximas as espécies vegetais que possuem micro-organismos que sobrevivem em simbiose com as plantas, estabelecendo assim zonas com elevada atividade biológica. Neste local ocorre uma relação dinâmica entre os micro-organismos e o ecossistema habitado, pois as comunidades de micro-organismos transformam continuamente nutrientes de vegetação morta em fontes de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes que podem ser usados pelos mangues (LI *et al.*, 2019) e em troca, exsudatos de raízes dos mangues servem com fonte de nutrientes para os diversos micro-organismos.

Isso ocorre devido ao processo de facilitação que ocorre entre as espécies, estudado inicialmente por Kropotkin (1842-1921). Desde então, os ecólogos têm investigado esse processo de facilitação, que na literatura, são denominados de auxílio mútuo, interações positivas, ajuda mútua, plantas de efeito viveiro, de berçário, plantas enfermeiras ou plantas vizinhas (HUXHAM *et al.*, 2019). É notório que as interações entre diversidade de micro-organismos e as espécies vegetais são fundamentais para a manutenção da produtividade, conservação e recuperação destes ambientes (SANTOS *et al.*, 2019).

Entretanto, alguns fatores bióticos e abióticos podem influenciar na diversidade desses micro-organismos, como relatado no trabalho de Su e colaboradores (2020), desenvolvido em Taiwan, onde verificaram que a salinidade, a temperatura e a sazonalidade podem modificar a composição da comunidade de isolados de micro-organismos da rizosfera. Em outro trabalho, Luo e colaboradores (2018) constataram a

influência positiva das raízes na diversidade de fungos e nas atividades de enzimas do solo.

Saravanacumar e colaboradores (2016), em um trabalho realizado no sudeste da Índia, verificaram que há influência dos fatores físico-químicos e saúde nutricional do solo na diversidade de micro-organismos. Cotta e colaboradores (2019) observaram diferenças significativas de abundância de espécies quando comparados solos sem impacto antrópico e áreas impactadas por ações antrópicas. A contaminação presente nos solos de manguezais, por exemplo, molda a comunidade de micro-organismos, comprometendo a decomposição de matéria orgânica (LI *et al.*, 2019).

Os manguezais proporcionam um ambiente com características singulares para a sobrevivência de fungos, bactérias e outros micro-organismos (JIA *et al.*, 2020). A diversidade dos micro-organismos em ecossistema manguezal revelam as principais características locais do ambiente, principalmente os micro-organismos do solo (RAMIREZ-VARGAS *et al.*, 2020).

Estudos envolvendo ecologia e taxonomia molecular têm contribuído com informações que auxiliam na identificação de fungos que sobrevivem no ecossistema manguezal (ABDEL-WAHAB, 2005). Esses trabalhos são comumente utilizados para identificação e caracterização de possíveis espécies novas de fungos (COUTINHO *et al.*, 2016), descobertas de novos metabólitos com potencial em aplicações industriais (FREIRE; VASCONCELOS; COUTINHO, 2014) e comparação entre espécies através de quimiotaxonomia (MUNIZ *et al.*, 2013).

Diversos micro-organismos desempenham papéis essenciais e prosperam em manguezais, entre eles estão as leveduras (JIA *et al.*, 2020). Entretanto, estudos sobre a composição das comunidades e distribuição de micro-organismos que sobrevivem em ambientes fisiologicamente peculiares e desafiadores, como os manguezais, ainda é incipiente (TAVARES *et al.*, 2021).

### **3.6 Leveduras**

Leveduras são micro-organismos eucariontes predominantemente unicelulares, que não produzem esporos, se reproduzem assexuadamente por brotamento ou fissão, e filogeneticamente são agrupadas nos filos Basidiomycota (subfilos: Pezizomycotina,

Taphrinomycotina e Saccharomycotina) e Ascomycota (subfilos: Pucciniomycotina, Agaricomycotina e Ustilaginomycotina) (KURTZMAN *et al.*, 2011).

Estudos sobre leveduras ambientais têm aumentado consideravelmente ao longo dos anos, principalmente com relação a biodiversidade, caracterização fenotípica, taxonômica, genética e aplicações biotecnológicas em diversos setores (BUZZINI, LACHANCE, YURKOV, 2017; MONAPATHI, BEZUIDENHOUT, JAMES RHODE, 2020). Entretanto, as informações contidas na literatura ainda são poucas se comparadas a vasta diversidade de leveduras existente em ambientes naturais (BUZZINI; LACHANCE; YURKOV, 2017).

As leveduras são amplamente distribuídas em ambientes marinhos, associadas a diferentes substratos, especialmente os que têm altas concentrações de matéria orgânica (WANG *et al.*, 2008; STARMER; LACHANCE, 2011) como os manguezais, que estão entre os ecossistemas mais produtivos do mundo em termos de produção de matéria orgânica e ciclagem dos nutrientes (KUSUMANINGTYAS *et al.*, 2019). Alguns autores relatam que a maior densidade de leveduras é encontrada nos primeiros centímetros da superfície de sedimento (HAGLER; MENDONÇA-HAGLER, 1981).

As leveduras marinhas podem ser facultativas (não são exclusivas de ambientes marinhos) ou obrigatórias (só sobrevivem em ambiente marinho) (KUTTY; PHILIP, 2008). São chamadas leveduras marinhas, as espécies que se desenvolvem melhor em águas oceânicas ou salobras do que em água doce (CHI *et al.*, 2009). As leveduras terrestres atuam em manguezais como saprotróficos, decompondo matéria orgânica presentes em sedimentos com composição lignocelulósica (SARAVANAKUMAR *et al.*, 2016). Além disso, nos manguezais as leveduras provenientes de diversos ambientes, atuam juntas na biofertilização do sedimento, realizando a ciclagem de nutrientes e transformando-os em micro nutrientes assimiláveis pelas plantas (LI *et al.*, 2019).

As leveduras também participam efetivamente da cadeia alimentar detritívora, pois são alimentos para invertebrados e zooplâncton presentes no ecossistema manguezal (AHMED *et al.*, 2019). Além disso, participam diretamente da reposição de nutrientes através da decomposição de matéria orgânica complexa (principalmente celulose, polifenóis, carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e lignina) presentes no acúmulo de serapilheira composta pela quantidade de material que cai da parte aérea das plantas (SWIFT *et al.*, 1979; LEROY *et al.*, 2017; IMCHEN *et al.*, 2018).

A decomposição dos resíduos vegetais e a avaliação da biomassa dos sedimentos fornecem informações essenciais para o entendimento da ciclagem de nutrientes e dos processos de manejo do ecossistema, que respondem a alterações sazonais, salinidade e a variação nos parâmetros físico-químicos (SPARLING, 1997; ALONGI, 2018; LI *et al.*, 2019).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Área de estudo**

As amostras de sedimentos foram coletadas no manguezal que está localizado às margens do rio Santo Antônio, no município de Barra de Santo Antônio (9°22'50.7"S e 35°30'13.9"W) situado no litoral norte do estado de Alagoas-Brasil. O município de Barra de Santo Antônio possui uma área de aproximadamente 131,364 km<sup>2</sup>, tem uma população estimada de 15.932 pessoas, resultando em uma densidade demográfica de 102,79 hab/km<sup>2</sup> (IBGE, 2019). Com o clima tropical úmido, o município possui médias pluviométricas anuais que variam entre 1800-1900 mm, temperatura mínima de 23°C e máxima de 36°C (SEMARH, 2019).

O município está localizado na região estuarina da foz do rio Santo Antônio (ANA, 2011). Às margens do rio Santo Antônio é possível observar uma grande ocupação urbana, plantação de coqueiros, inúmeras fragmentações vegetativas e poluição no corpo aquático decorrente de despejos inadequados de resíduos, impactando diretamente o manguezal e os organismos que dele sobrevivem (ALAGOAS, 2017).

A região estuarina do rio Santo Antônio tem suas margens colonizadas por manguezais, e estão inseridas na Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais (APACC), uma UC federal que é gerida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Entretanto, Coelho Junior e colaboradores (2015) verificaram que os manguezais da APACC ainda são pouco estudados, principalmente no que se refere a biodiversidade dos organismos, suas funções e papel ecológico.

### **4.2. Coleta e delineamento amostral**

As coletas foram realizadas nos meses de março e outubro de 2020 e março e agosto de 2021. No manguezal foram amostrados sedimentos de três pontos ao longo

do rio (Figura 4). O primeiro ponto foi nos primeiros fragmentos de manguezal (seguindo critérios de acessibilidade e pouco alagamento) a 3,5 Km de distância do mar; o segundo ponto está localizado na parcela intermediária do manguezal com 5,0 Km de distância do mar e o terceiro ponto tem um distanciamento de 6,5 Km do mar, totalizando assim três pontos com distância de 1,5 Km de distância entre si. Os critérios de escolha foram: possuir pouco alagamento e possuir acessibilidade para encostar o barco, descer e coletar as amostras. Em todos os pontos do manguezal foram obtidas as coordenadas geográficas com o auxílio de um aparelho de Global Position System (GPS).

**Figura 4.** Data not shown

O procedimento de coleta das amostras em cada ponto foi constituído de duas etapas. As amostras da primeira parte da coleta foram destinadas à análise de coliformes do sedimento e da água. Para tanto, foram coletados sedimentos em tubos tipo Falcon estéreis, e 1000 mL de água (com aproximadamente um metro de distância da margem) em recipientes plásticos previamente esterilizados. Foram armazenados em caixas térmicas contendo gelo em gel, seguindo as recomendações do Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras de Água (CETESB; ANA, 2011).

A segunda parte foi constituída por amostras do solo para determinação da comunidade de leveduras. Foram coletados 100 g de sedimento com profundidades de 15 cm de sedimentos rizosféricos adjacentes à espécie *L. racemosa*, presente em todos os pontos de amostragem. Os sedimentos coletados foram acondicionados em sacos *zip-lock* estéreis e armazenados em caixas térmicas contendo gelo em gel.

Foram coletadas 24 amostras de sedimentos (6 amostras de cada ponto de amostragem) destinadas ao isolamento de leveduras. Foram coletadas também 12 amostras destinadas à análise de coliformes (três amostras em cada ponto). Todas as amostras foram transportadas até o Laboratório de Diversidade Molecular – UFAL para o processamento.

### **4.3. Análises da água**

#### **4.3.1. Parâmetros físico-químicos**

Em todos os pontos de amostragem foram aferidos os parâmetros físico-químicos “in situ” através da sonda multiparâmetros devidamente calibrada modelo YSI-6600, com sensores de temperatura (°C), condutividade ( $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$ ), oxigênio dissolvido (em porcentagem [%] e concentração [ $\text{mg}.\text{L}^{-1}$ ]), faixa de pH, salinidade (ppb), clorofila (g/L) e turbidez (NTU).

Para tanto, a sonda foi instalada verticalmente, ligando os cabos conectores na sonda e no datalogger SDI-12 (SDI12, 2013). Foi coletado aproximadamente um litro de água no dispositivo de coleta da sonda, os sensores foram introduzidos dentro do recipiente. Em seguida, o datalogger foi iniciado para as leituras dos parâmetros, após a estabilização os dados foram anotados (MANUAL YSI, 2012).

#### **4.3.2. Parâmetros microbiológicos**

##### **4.3.2.1. Coliformes**

Para verificar a interferência antrópica no ambiente, as amostras de água foram submetidas ao método do Número Mais Provável (MPN) para coliformes totais, de acordo com a *Environmental Protection Agency* (USEPA, 2006), Manual prático de análise de água da FUNASA (2013) e *Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater* (BAIRD *et al.*, 2017).

Foi inoculado 1 mL das amostras de água em quintuplicatas contendo 5 mL do meio Lauril triptose com tubo de Durham. O material foi incubado a 35°C durante 24–48 h e observada a produção de gás. Em amostras positivas para a formação de gás, foram realizados os testes confirmatórios para coliformes totais.

##### **4.3.2.2. Coliformes totais**

As amostras positivas no meio Lauril triptose foram inoculadas em meio Caldo Bile Verde Brilhante 2% com tubo de Durham e incubadas durante 24-48 h a 35°C. Se houver a produção de gás, o teste é considerado positivo.

#### **4.4. Análises do sedimento**

##### **4.4.1. Parâmetros físico-químicos**

Os parâmetros pH e temperatura foram aferidos no local com o auxílio do medidor *Soil Test* portátil da Ccouay (MANUAL CCOUAY, 2017).

##### **4.4.2. Parâmetros microbiológicos**

Essa etapa foi realizada conforme o item 4.3.2

###### **4.4.2.1. Coliformes**

Foram pesados 10 g das amostras de sedimentos, em seguida foram diluídos em 90 mL de solução salina 0,85%, submetidos a agitação por 10 min a 150 RPM. Posteriormente, foi inoculado 1 mL das diluições em quintuplicatas em tubos contendo 5 mL do meio Lauril triptose com tubo de Durhan.

#### **4.5. Comunidade de leveduras**

##### **4.5.1. Processamento das amostras, isolamento e conservação das leveduras**

O processamento dos sedimentos coletados foi realizado segundo o método de Clark (1965) modificado: foram pesados 25 g de cada amostra e adicionados a 225 mL de água destilada esterilizada em frascos tipo *Erlenmeyer*. Após, a amostra foi submetida à agitação a 150 rpm por 5 min.

Um volume de 100 µL de cada uma das diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  foi semeado, em duplicata, em Ágar YM modificado (0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona bacteriológica, 1% de glicose, 2% de ágar, 0,04% de cloranfenicol, pH 4,0). As placas foram incubadas a 25-28 °C durante 5-7 dias. Após o período de incubação, o crescimento nas placas foi verificado diariamente e as colônias de leveduras foram isoladas em Ágar YEPD (2% de glicose, 2% de ágar, 1% de peptona bacteriológica e 0,5% de extrato de levedura).

Os isolados de leveduras foram estocados e conservados utilizando três meios de cultura e condições variadas, com o intuito de conservar e manter a integridades das

células para posteriores análises: 1) Ágar GYMP inclinado (2% de glicose, 2% de extrato de malte, 0,5% de extrato de levedura, 0,2% de fosfato de sódio monobásico e 2% de ágar); 2) Caldo GYMP 50% (1% de glicose, 1% de extrato de malte, 0,25% de extrato de levedura e 0,1% de sódio monobásico) ambos os meios conservados à 4 °C; e o 3) Caldo GYMP com glicerol (2% de glicose, 2% de extrato de malte, 0,5% de extrato de levedura, 0,2% de fosfato de sódio monobásico) adicionando glicerol para uma concentração final de 30% e conservação à -20 °C.

#### **4.5.2. Classificação morfológica das leveduras**

Para a caracterização morfológica dos isolados, foram verificadas as estruturas colonial e celular através da microscopia óptica usando os aumentos de 40X e 100X. As células foram caracterizadas de acordo com a sua forma, tamanho, tipo de divisão e número de brotamentos (KURTZMAN *et al.*, 2011). Após o procedimento de macroscopia e a microscopia foram anotadas as observações e descartados os clones.

#### **4.5.3. Identificação molecular das leveduras**

Para a identificação molecular, os isolados passaram por extração do DNA genômico total, seguindo o protocolo proposto por Sambrook e Russel (2001) com modificações. Em seguida, a região D1/D2 do gene 26S do rRNA foi amplificada por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando os iniciadores NL-1 (5'- GCA TATC AAT AAG CGG AGG AAA AG -3') e NL-4 (5'- GG TCC GTG TTT CAA GAC GG -3') (KURTZMAN; ROBNETT, 1998).

A PCR foi feita em um volume final de reação de 25 µL. Para tanto, foram utilizados 20 pmol/µL dos oligonucleotídeos iniciadores, 0.5 unidade (1U/µL) de Taq polimerase, 2.5 µL de tampão 10x, 2 mM de dNTPs e 50 mM de MgCl<sub>2</sub>. A reação foi realizada em 36 ciclos térmicos em termociclador *BioRad* modelo *T100 Thermal Cycler*. Para a desnaturação inicial, foi utilizada temperatura de 95 °C por 5 min, seguida 95 °C de desnaturação por 45 seg, 56 °C de anelamento por 30 seg, 72 °C de extensão durante 1 min. Por último, a extensão final foi realizada em 72 °C durante 5 min.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel contendo 1% de agarose tamponada com TAE 1X, diluído a partir da solução estoque concentrada 50X (242g Tris, 57,1 mL de ácido acético, 100 mL de EDTA 0,5M pH 8, completando com água destilada até 1 L) (COBBAN *et al.*, 2016) e corados no banho

de brometo de etídio (EtBr) (200 µL de brometo 10 mg/mL e 400 mL de água destilada).

Os produtos foram purificados acrescentando 5 µL de acetato de sódio 3 M a -20 °C, em seguida foram adicionados 1 µL do DNA a ser amplificado, 20 µL de isopropanol conservado a -20°C durante 30 min e centrifugados a 21293 x g, por 5 min. O isopropanol foi retirado e foram adicionados 50 µL de etanol 70% a -20 °C. Em seguida, o etanol foi removido e as amostras foram secas à temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspensionado em 15 µL de água destilada estéril. A pureza e a quantidade de produto da PCR foram verificadas por espectrofotometria a 260 nm e sequenciados utilizando o mesmo conjunto de *primers* segundo protocolo da Plataforma Multiusuária de Sequenciamento de DNA do Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil) em um ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA) seguindo as recomendações do fabricante.

As sequências foram geradas utilizando o programa STADEN Package (STADEN *et al.*, 2000) e em seguida foram comparadas com sequências anteriormente depositadas no banco de dados do GenBank no site do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) e o algoritmo Nucleotide-Blast (BLASTn) (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

## **4.6. Análises estatísticas**

### **4.6.1. Análise de diversidade de leveduras e influência fatores do ambiente**

Após a identificação molecular das espécies de leveduras, foi feita a curva de acumulação de espécies construída pelo método de rarefação com 50 repetições bootstrap. A extrapolação foi calculada usando o estimador Chao1. A análise foi implementada no software R usando o pacote iNEXT (Hsieh *et al.*, 2016). Os índices de diversidade de Shannon (H') e dominância de Simpson (D) foram calculados com base nos dados de abundância e riqueza de espécies, usando o pacote de software de estatística paleontológica para educação e análise de dados (PAST V4) (Hammer *et al.*, 2001).

Para verificar a variação taxonômica entre as espécies obtidas foram utilizados os índices de Distinção Taxonômica Média (AvTD) (Clarke & Warwick, 1998) e Distinção taxonômica total (TTD) (CLARKE & WARWICK, 2001), estimados no software R (R

TEAM, 2016) usando o pacote Vegan (DIXON, 2003) calculados usando dados dos nós filogenéticos da espécie, família, ordem, subclasse, classe, subfilo e filo. A classificação completa de cada espécie foi obtida no site do Mycobank (<https://www.mycobank.org>), e quando necessário, na literatura especializada, grupos indefinidos foram considerados politomias.

Para verificar se há variação intraespecífica entre as leveduras associadas a sedimentos adjacentes à rizosfera espécie *L. racemosa* nos pontos amostrais foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA), seguida de um teste de Tukey, elevada ao quadrado para atender a suposição de normalidade. Um teste de Kruskal-Wallis, seguido de um teste de Wilcox pareado, aplicando o método de Bonferroni para ajustar o valor p. A análise de variância PERMANOVA com permutações foi aplicada para verificar a probabilidade de os grupos formados serem encontrados ao acaso por meio de uma Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Usamos dados sobre a abundância de espécies de leveduras de cada amostra de solo nos três pontos de coleta para gerar a dispersão pela distância de Bray Curtis. Um dimensionamento multidimensional não métrico (NMDS) foi construído no software R usando o pacote Vegan para visualizar os dados da comunidade plotados sobre os dados dos parâmetros do ambiente. Todos os gráficos mostrados neste estudo foram plotados usando o pacote ggplot2 (Wilke, 2016).

A frequência de ocorrência dos isolados foi calculada pela seguinte expressão:  $FC = TO \times 100 / TS$ , que corresponde à frequência de ocorrência (FC) é igual à ocorrência total da espécie (TO), multiplicada por cem (correção para percentual) é dividido pelo total de amostras (TS).

## 5. MANUSCRITO

### **Diversity and intraspecific variation in the yeast community associated with rhizospheric sediments of *Laguncularia racemosa* in a tropical mangrove**

Aldeci França Araujo dos Santos<sup>1</sup>, Ciro R. Félix<sup>1</sup>, Hector M. C. Navarro<sup>1</sup>, Victor Tavares<sup>2</sup>, Bruno Nascimento<sup>2</sup>, Vitoria Barros<sup>2</sup>, Gustavo Paulino<sup>2</sup>, Melissa Fontes Landell<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, Maceió, AL, 57072-900, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil.

\*Correspondence: Melissa Fontes Landell, Setor de Genética - ICBS, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro dos Martins, CEP: 57072-900, Maceió - AL, Brasil, Tel. (+55) 82-32141995.

(e-mail: melissa.landell@gmail.com)

#### ORCID

Aldeci França Araujo dos Santos - 0009-0002-2214-3267

Ciro R. Félix - 0000-0001-5087-8872

Hector M. C. Navarro - 0000-0002-5613-2227

Victor Tavares - 0000-0003-1492-0097

Bruno Nascimento - 0000-0001-6690-0595

Vitoria Barros - 0000-0001-9826-3631

Gustavo Paulino - 0000-0003-2825-3133

Melissa Fontes Landell - 0000-0001-6848-0803

## ABSTRACT

Mangroves are transition ecosystems between the marine and terrestrial environment, present in tropical and subtropical regions. It is considered one of the most important complex ecosystems because, given the high organic content in the soils and rhizosphere, it is possible to cover a diversity of microorganisms interacting with each other, other organisms, and environmental factors. Several studies have demonstrated associations between bacteria and some mangrove plant species. However, yeast communities associated with mangrove species receive much less attention. In this context, we aimed to survey the yeast community associated with sediment adjacent to rhizosphere of the mangrove species *L. racemosa* and determine whether intraspecific variation in the diversity of the community associated with this species along a Brazilian tropical mangrove. Sampling was carried out at three locations on a transect along the Santo Antônio River in a mangrove forest in northeastern Brazil. A total of 132 isolates from 24 samples were identified by sequencing the D1/D2 region of the LSU 26S rDNA gene. The analysis of the sequences revealed 32 species associated with 18 genera, of which 68.8% belong to the phylum Ascomycota and 31.2% to the phylum Basidiomycota. Among the identified species, we report the presence of a possible new species belonging to the genus *Barnettozyma*. The composition of the yeast community did not vary significantly. Most species (53.1%) were singletons (species with a single occurrence record). Greater taxonomic and phylogenetic diversity was observed at the sampling site farthest from the sea, showing that there is variation in taxonomic and phylogenetic diversity in yeast communities between a single host species in an environmental transect. These results indicate that the rhizosphere of plant species of mangroves is a rich and diverse environment in yeast species, mainly species already reported in other environments as degrading organic matter. The community is relatively stable, indicating that, like the plants, the species that survive are the most adapted to mangrove conditions, and intraspecific variation in diversity may be related to distance from the sea. This study presents an important set of data that can serve as a basis for studies on the diversity of yeasts in the rhizosphere of mangroves, so we suggest further studies to elucidate which environmental factors in temporal community diversity are associated with plant species present in mangroves.

**Keywords:** Mangrove ecosystems; sediment microorganism; plants microorganisms; tropical; fungi.

## INTRODUCTION

Mangrove forests in estuarine zones are considered ecosystems of high productivity and biodiversity (Allard et al. 2020). They have high ecological and economic value, such as carbon sequestration and coastal protection (Barbier et al. 2011; Hochard et al. 2019; Osorio et al. 2016). The mangroves are located at the interface between seawater and freshwater. They are marked by the 'confrontation' between rivers and the sea environmental conditions with daily fluctuations in various environmental factors (Yuan et al. 2011; Zhang et al. 2021).

Despite the environmental conditions, these ecosystems are composed of unique plant species that thrive in tropical and subtropical environments (Baskaran et al. 2012). The main species in Brazil are *Avicennia germinans*, *Avicennia schauerian*, *Laguncularia racemosa*, *Rhizophora harrisonii*, *Rhizophora mangle*, *Rhizophora racemosa* (Schaeffer-Novelli 2018). *L. racemosa* is a typical mangrove tree, known as white mangrove, that has rapid growth and adapted to salinity and anoxic substrate conditions (Li et al. 2020). In addition, individuals of this species have supporting roots and pneumatophores (Flechtmann et al. 2007), which attach to the muddy substrate.

In muddy and humid soils, microbial communities adhere to the roots and the substrate. This intersection between soil and root is known as the rhizosphere environment (Bulgarelli et al. 2013). In these environments, the rhizospheric effect occurs when root exudates stimulate the prevalence of microorganisms. Unlike terrestrial environments, where root exudates stimulate the abundance of microorganisms, in mangrove plants root exudates may act by selecting groups of some microorganisms (Luo et al., 2018). Even so, microorganisms that thrive in mangroves exhibit high adaptability and genetic diversity (Allard et al. 2020; Singh et al. 2020).

Although this association between plants and mangrove microorganisms is still poorly understood, it is known that some groups of microorganisms are specific to each plant, indicating selectivity in the groups that inhabit mangrove plant species (Dias et al. 2012). Microorganisms associated with the rhizosphere of soil from mangrove plants have already been reported in the literature, but most refer to prokaryotic microorganisms associated with other mangrove species (Bezerra et al. 2022; Craig et al. 2020).

The yeasts are an essential group in the mangrove ecosystem (Arfi et al. 2012a). They are microscopic and unicellular fungi grouped into phyla Ascomycota and Basidiomycota (Kutty and Philip 2008) with a ubiquitous distribution, occupying atmospheric, aquatic, and terrestrial environments (Buzzini et al. 2017). In mangroves, the yeast diversity is related to several ecosystem roles, such as waste conversion and possible bioindicators of environmental quality (Araujo and Hagler 2011; Miranda et al. 2020). Notwithstanding, its diversity allows it to maintain ecological relationships with different organisms, such as mammals, other microorganisms, and plants (Starmer and Lachance 2011), surviving and adapting to unique environmental conditions like the mangroves (Botha 2011). In mangroves, there are differences in the community of yeasts that inhabit it, such as the presence of species that are possibly endemic to mangroves and are commonly found in sparsely inhabited areas. However, in areas with greater urban occupation, there may be a more punctual presence of species associated with other environments and humans (Buzzini et al. 2017).

It is essential to have additional information about the diversity and distributions of yeasts in the rhizosphere of mangrove species, to help understand the intimate association between plants and this group of microorganisms. In this work, we aimed to survey the yeast community associated with sediments adjacent to rhizosphere of the mangrove species *L. racemosa* and determine whether intraspecific variation in the diversity of the community associated with this species along a Brazilian tropical mangrove.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Area description**

Sediment samples were collected along the 2.09 Km<sup>2</sup> mangrove area of the Santo Antônio River, located in the eastern region of the State of Alagoas (9° 22'50.7"S, 35° 30'13.9"W) in northeastern Brazil. The Santo Antônio River is part of the Costa dos Corais Environmental Protection Area (APACC), a Federal Conservation Unit managed by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio), which covers a territory of approximately 4.135 km<sup>2</sup>, contemplating beaches and mangroves (Ferreira Maida 2006).

The choice sites where the species of *L. racemosa* were collected followed the criteria of accessibility and availability of areas with low water levels at low tide. The site 1 (S01) (9° 22'50.9"S, 35° 30'13.9"W) corresponds to the portion closest to the sea (3.5 km), the site 2 (S02) (9° 22 '11.0"S, 35° 29'58.3"W) is the plot located in the middle between the other sites with a distance of 5 km from the sea, and the site 3 (S03) (9° 22'30.0"S, 35° 30'34.5"W) is located in the furthest part of the sea with 6.5 km.

**Figure 1-** Data not shown

### **Sediment sampling and yeasts isolation**

The collections occurred in March and October 2020, and March and August 2021, totaling four collections in three sites each (S01, S02, and S03), and at each location, two samples were collected, totaling 24 samples. Each sediment sample collected at each sampling site contained approximately 100 g of sediment with silty-clay compositional characteristics, muddy, rich in organic matter (mainly of plant origin), strong odor and dark brown color (characteristic of soils with hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)), collected at a depth of 10-15 cm, at low tide 0.0-0.3, sampled close to the species *L. racemosa*. The collected sediments were stored in sterile bags and transported on ice to the laboratory, where they were processed within 24 h. Permission to collection was granted by the Instituto Brasileiro de Meio Ambiente, license nº 75677-1.

A total of 25 g of the sediment samples were diluted in 225 mL of sterile distilled water and shaker at 150 rpm for 5 min (Clark 1965). We inoculated 100 µL of decimal dilutions in Wickerham's YM medium (1% glucose, 0.3% malt extract, 0.3% yeast extract, 0.5% peptone, 2% agar) pH 4.0, supplemented with 0.04% chloramphenicol, 0.0033% rose bengal and incubated at 25°C for 7 days. The growth on plates was verified, and all yeast colonies were isolated on the YEPD medium (2% glucose, 2% agar, 1% bacteriological peptone, and 0.5% yeast extract) (Gomes et al. 2016). Morphological characteristics were observed and recorded. CFUs of each morphological type were counted to estimate yeast abundance using the equation  $Ab = \frac{(w \cdot (c \cdot 10))}{s}$ , where 'Ab' is the abundance in CFU/g, 'w' is the dilution volume, obtained from the sum of water with the sediment, 'c' is the average number of CFU counted in the undiluted

plates ( $10^{-1}$ ) or in the diluted plates where the dilution factor has already been corrected, and 's' is the mass of sediment used in dilution in grams. The isolates were preserved in agar slants GYMP medium (2% glucose, 2% malt extract, 0.5% yeast extract, 0.2% monobasic sodium phosphate, and 2% agar), covered with sterile mineral oil and kept at 4 °C.

### **Molecular identification of yeast isolates**

DNA extraction was performed for molecular identification, as described by Paulino et al. (2017a). To amplify the D1/D2 domain of LSU rDNA, primers NL1 and NL4 were used (Kurtzman and Robnett 1998). PCR was performed as described by Paulino et al. (2017a) DNA sequencing was performed using the same primer sets with protocol facilities from the Plataforma Multiusuária de Sequenciamento de DNA at the Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva of the Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brazil) in an automated sequencing system ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequences were selected using STADEN Packet (Staden et al. 2000), compared with sequences deposited in the GenBank database using the Nucleotide-Blast (BLASTn) algorithm (Altschul et al. 1990), and aligned with the closest type sequence, using the MEGA program (Kumar et al. 2018).

### **Characterization of the environment**

#### **Physical-chemical parameters**

The physical-chemical parameters of water were measured in situ in all sampling sites using a calibrated multiparameter probe model YSI-6600, with sensors for temperature, dissolved oxygen, pH, and salinity, following the recommendations in the YSI Manual (2012 model). About the sediment, the pH and temperature parameters were also measured in situ using a portable Soil Test meter, following the recommendations of the manufacturer's manual (manufacturer: 2 Vitens).

#### **Coliform bacteria test**

The water and sediment samples were tested for coliform bacteria analysis. First, sediment was collected in sterile falcon tubes at each spot, while 1000 mL of river water was collected in previously sterilized plastic containers. Both were stored on ice until the laboratory, following the recommendations of the National Guide for the Collection and Preservation of Water Samples (Brandão et al. 2011).

The samples were submitted to the Most Probable Number (MPN) method for Total Coliforms in water and sediment, following the recommendations of the standard methods for examining water and sewage (Rice et al. 2017).

### **Statistical Analysis**

The Shannon diversity ( $H'$ ) and dominance ( $D$ ) indices were calculated using the Paleontological statistics software package for education and data analysis (PAST V4) (Hammer et al. 2001). The Average Taxonomic Distinctness (AvTD) (Clarke and Warwick 1998) and Total taxonomic distinctness (TTD) (Clarke and Warwick 2001) indices were estimated in the R software (R Team 2016) using the Vegan package (Dixon 2003). The AvTD and TTD were calculated using data from the species, family, order, subclass, class, subphylum, and phylum phylogenetic nodes. The complete classification of each species was obtained from the Mycobank website (<https://www.mycobank.org>), and when necessary, from specialized literature, undefined groups were considered polytomies.

An Analysis of Variance (ANOVA) was performed to verify the difference between the richness and abundance of yeasts among the sampling points, followed by a Tukey test, where the response variables were transformed by squaring them up to fulfill the normality assumption. A Kruskal-Wallis test, followed by a pairwise Wilcox test applying the Bonferroni method to adjust the p-value for the sample size were used to verify the hypothesis of significant variation among the three collection points of i) AvTD, ii) TTD, iii) Shannon diversity index ( $H'$ ) and iv) dominance index ( $D$ ).

A Permutational analysis of variance (PERMANOVA) with permutations was applied to verify the probability of the formed groups being found by chance through a Principal Coordinates Analysis (PCoA). We used data on the abundance of yeast

species from each soil sample at the three collection points to generate the dispersion by Bray Curtis distance.

The frequency of occurrence of the isolates was calculated by the following expression:  $FC = TO \times 100 / TS$ , which corresponds to the frequency of occurrence (FC) is equal to the total occurrence of the species (TO), multiplied by one hundred (correction for percentage) and divided by the total of samples (TS).

## RESULTS

### Physicochemical and microbiological characteristics of mangrove

The physical-chemical parameters measured in the soil of the collection sites and in the river's water immediately adjacent to these same sites are shown in Figure 2. Most of them did not vary significantly across the sampling points, which reflected the homogeneity in the variance ( $p > 0.05$ ). Only dissolved oxygen and soil pH showed a significantly different variance between the points. Point S01 (closest to the sea) had the highest variance in these two parameters (Figure 2b e 2f). However, a clear trend can be observed in parameters such as salinity, which, as expected, considerably decreases as one moves away from the sea (Figure 2e), and dissolved oxygen, which follows the reverse pattern and increases as it approaches the sea (Figure 2f).

### Figure 2. Data not shown

Regarding quantifying total thermotolerant coliforms (TTC), all points and collections showed high values, both in soil and water. In most collections, the average TTC exceeded 16.000 MPN, and only in the March 2021 collection was the amount of TTC lower,  $6.867 \pm 4.041$  MPN in water and  $7.833 \pm 2.367$  MPN in soil.

### Diversity of yeasts associated with *L. racemosa*

We obtained a total of 132 isolates, 26 from site 1, 29 from site 2, and 77 isolates at site 3. The molecular identification resulted in a total richness of 32 yeast species,

where the phylum Ascomycota and Basidiomycota represented 68.8% and 31.2%, respectively (Table 1). Regarding the subphylum, Saccharomycotina was the richest taxon in mangrove sediment, with 40.5%, followed by Agaricomycotina, with 31.2%, and Pucciniomycotina, with only 9.3%, grouped into 18 genera (Table 1).

The richest genera were *Pichia* and *Candida*, with five and four species, respectively. Moreover, the most frequently isolated species were *Candida tropicalis* which occurred in 45.8% of the samples and *Candida (Pichia) pseudolambica*, and *Papiliotrema laurentii* which both occurred in 33.3% of the samples collected. These three species represent only ~10% of the recorded richness, but if considered together, they occurred in all samples. Most species (53.1%) were singletons (species with a single occurrence record). In addition, the strain *Barnettozyma* sp. LS 115 was assigned as a possible species.

Similar to those observed in the frequencies of occurrence, the abundances also had an asymmetrical and one-tailed distribution, with few isolates with high abundance values and many isolates with low abundances. The minimum abundance, mode, and median among the isolates were the same ( $1.0 \times 10^2$  CFU/g); the maximum abundance was  $5.0 \times 10^3$  CFU/g recorded only for the species *Lodderomyces elongisporus*, obtained from isolate LS 251. In addition, the abundance means, and deviation standard were  $3.61 \times 10^2 \pm 6.12 \times 10^2$  CFU/g, respectively. The abundance means of the phylum Ascomycota was  $3.91 \times 10^2 \pm 6.65 \times 10^2$  CFU/g, and the Basidiomycota was  $2.5 \times 10^2 \pm 3.42 \times 10^2$  CFU/g. The difference in the abundance between the phyla was not significant ( $p=0.15$ ). Considering the samples, the average yeast CFU per gram of soil was  $1.4 \times 10^3 \pm 1.48 \times 10^3$ , ranging between  $1.0 \times 10^2$  and  $5.1 \times 10^3$  CFU/g, with a median of  $1.0 \times 10^3$  CFU/g

**Table 1.** Data not shown

### **Intraspecific variation of diversity in the yeast community of the *L. racemosa* rhizosphere in an environmental transect**

In absolute numbers, the distance from the sea caused the richness to increase from 13 to 16 and 23 species between points S01, S02, and S03, respectively (Figure 3). About 60% of the species were recorded exclusively at a single sampling point, and 22% were shared among the three points.

**Figure 3.** Data not shown

However, there is no perceptible clustering, and PERMANOVA indicated that the established clusters (the three sampling points) generate a scatter pattern with a high probability of being found at random ( $p=0.837$ ), which indicates the compositional stability of the yeast species between the points (Figure 4). On the other hand, while the beta-diversity metrics did not diverge significantly between the points, the alpha-diversity indicators tended to vary among the points, showing gradual patterns where the alpha-diversity decreases as the species is located near the sea point (Figure 5a-f).

**Figure 4.** Data not shown

**Figure 5.** Data not shown

All diversity indicators varied significantly among the rhizosphere samples of *L. racemosa* species at points along the river, both taxonomic diversity indicators, richness ( $p=0.0096$ ), Shannon index ( $p=0.05$ ), and dominance ( $p=0.05$ ), as for the indicators of phylogenetic diversity, AvTD ( $p=0.04$ ), and TTD ( $p=0.02$ ). In addition, the observed abundance also increased as the species were at sampling points farther from the sea ( $p=0.05$ ). When compared in pairs, the difference between the diversity contained in the rhizosphere of the species at each point was significant or marginally significant only between the diversity in the rhizosphere of the species at the extreme points of sampling; species located closest and farthest from the sea, the rhizosphere diversity of

the species located at the intermediate site was not significantly different from the others. The location of *L. racemosa* species at the sampling points explained a reasonable proportion of the data variation in species richness ( $R^2=0.37$ ) and yeast abundance ( $R^2=0.25$ ).

## **DISCUSSION**

### **Description of the environmental factors of the studied mangrove and the diversity of yeasts**

The yeast strains isolated here may represent a significant portion of the yeast community associated with *L. racemosa*. The physical-chemical parameters indicated no statistically significant difference between the sites sampled, remaining constant along the mangrove, mainly characterized by relatively high temperatures of water and sediment more within the normal range of a typical tropical environment. However, unlike our findings in the studies carried out in China and India, Liu et al. (2020) and Saravanakumar et al. (2016), found that increasing soil temperature significantly affects the composition of the mangrove microorganism community.

Another characteristic of this mangrove was the predominance of acid values in the sediment and the water. In their studies, Bahram et al. (2018) found an impact of several environmental variables on microbial diversity. They reported that soil pH influences microbial community diversity. Yeasts tolerate acidic pH ranges, facilitating competition with other microorganisms, such as bacteria (Starmer and Lachance 2011). In addition, the studied mangrove showed increased dissolved oxygen and salinity values at the site near the sea, which was already expected. The diversity and colonization of microorganisms in coastal environments are governed by several factors, including the distance from the sea, which determines the level of salinity found in the environment (Paulino et al. 2020). Here, we found no relationship between environmental factors and yeast diversity.

Despite being in an environmental protection area, we found high total coliform counts at all sampled points. This group of microorganisms can be naturally in the environment, not indicating that the analyzed water was compromised, but it may indicate the presence of potentially pathogenic bacteria. Similar results were obtained by Paulino et al. (2017b) reported high coliform counts in water samples from sampled rivers, including the Santo Antonio River. In addition, they established a relationship between high amounts of thermotolerant coliforms and higher counts of pathogenic bacteria.

### **Yeast abundance analysis at phylum level**

Based on the isolation conditions performed in this study, we obtained 132 isolates. After analyzing the sequences, we found that the phylum Ascomycota was more representative and abundant (69%), while the Basidiomycota yeasts were less prevalent (31%). However, representatives of both phyla were found in all three sampling sites. We corroborate that the phylum Ascomycota is the most representative of the yeast in these environments. Chi et al. (2012) collected several samples from different substrates of mangroves, including sediment. They used the same isolation conditions as our study and obtained 269 yeasts, 95.2% belonging to the phylum Ascomycota. Using independent culture methods in Haldar and Nazareth (2019), mangrove sediment samples revealed that Ascomycota was prevalent (80%) and the phylum Basidiomycota was less prevalent (7%).

The phylum Ascomycota is a critical ecological assembly representing 70% of marine fungal species (Jones et al. 2015). Arfi and collaborators (2012b) studied the fungal communities in the marine and aerial parts of the plant species *Avicennia marina* and *Rhizophora stylosa* in a mangrove in France. They reported the dominance of Ascomycota (82%) compared to Basidiomycota (3%) and inferred that probably the representatives of these two phyla play valuable ecological roles in mangroves. This representativeness of the phylum Ascomycota in mangroves is mainly related to the

availability of organic matter (Kutty Philip 2008). Members of this phylum are saprophytes on substrates rich in organic carbon and sugars (Suh et al. 2017).

### **Diversity of yeast genera and species**

In their published study, Devadatha et al. (2021) reviewed the occurrence of fungi, including yeasts, in mangroves. Comparing our results with this work and the more recent literature, we found that 12 of the 32 yeast species at the sampling sites represent the first record in mangroves (Table 1). Among these species reported here, it was possible to evidence that most are species frequently isolated from soils, mangrove sediments, or associated with plants.

The soil species reported here in this study were *Papilioterema laurentii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia terricola*, and among the species with the first record in mangroves, two were previously isolated from the soil: *Torulaspora indica* (isolated from coal mine soil and an agricultural field) and *Candida ghanaensis* (isolated from Ghana soil) (Botha et al. 2006; Parle and di Mena 1966; Saluja et al. 2012; Kurtzman et al. 2001). Soil yeasts are reported in several studies, but their interaction with the inhabited environment and their distribution are still poorly understood, especially when it comes to yeasts in tropical environments (Yurkov 2018). Botha (2011), in his studies, found that the microorganisms in the soils of inhabited ecosystems maintain different ecological relationships with other macro and microorganisms. Despite being characterized by surviving in environments with little availability of nutrients, they are also found in soils close to the rhizosphere of plants, a site rich in organic matter. The yeast community responds to abiotic factors, but what influences the diversity of yeasts in soils are plant species close to the ground (Yurkov 2018), seasonality, soil composition, and sampling depth (Vadkertiová et al. 2017).

Rainforest sediments harbor a greater diversity of yeasts as they are rich in organic matter compared to soils with low nutrient availability (Spencer and Spencer 1997). Mangroves are characterized by wet, muddy and saline soil (UNESP, 2018), that

harbor a vast diversity of microorganisms (Hagler et al. 2017). Among the yeasts reported here and previously found in mangrove sediment are *Candida pseudolambica*, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces aestuarii*, *Papiliotrema laurentii*, *Pichia occidentalis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saturnispora silvae*, and *Saccharomyces cerevisiae* (Hoondede et al. 2019, Hagler et al. 2017).

Among these species, we highlight the presence of *K. aestuarii*, frequently isolated in mangroves (Hoondede et al. 2019, Chi et al. 2012). This species was described in estuaries in Florida (Fell 1961) and later in mangroves in Brazil, isolated for the first time from invertebrate detritus (Araujo et al. 1995). *K. aestuarii* is identified in the literature as an indicator of environmental quality for preserved mangroves (Araujo et al. 1995, Araujo and Hagler 2011). However, the presence or absence is not conditioned by the presence of the coliform group, that is, and this species is associated with other types of environmental interference from masonry (Araujo and Hagler 2011). In our study, *K. aestuarii* was isolated from all sampling sites, containing high coliform counts. Thus, we corroborate the study by Araujo and Hagler (2011) that the distribution of *K. aestuarii* is not related to the presence of the coliform group. Its occurrence at all sampling points may suggest that this species is closely related to the sediments close to preserved mangrove plant species.

However, this species is also considered frequent in polluted sediments (Hagler et al., 1982). *C. tropicalis* is reported in the group of human pathogens (Wang et al., 2007), but is frequently isolated from mangroves (Chi et al., 2012; Hagler et al., 2017), suggesting a relationship with environmental quality (Hagler 2006; Starmer Lachance 2011).

Isolate LS 115 belongs to the genus *Barnettozyma* and has been designated as a possible new species. This genus was suggested by Kurtzman et al. (2008) to group species of the genera *Candida*, *Pichia* and *Williopsis* that were dispersed among taxa. Species of this genus have recently been reported to have functions that suggest a close relationship with plant species. Arrey et al., (2021), in their study carried out in Africa, described a new species of this genus isolated from the intestinal tract of

termites, and found that this species is a degrader of polymers derived from plant species. Fang et al. (2021), in China, demonstrated that a species of the genus *Barnettozyma* showed efficient capacity for heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. These processes occur mainly in acidic or saline soils (Yokoyama et al., 2012), such as mangroves.

### **Intraspecific variation in the yeast community associated with rhizospheric sediments of *L. racemosa***

Mangroves are marked by the 'confrontation' between rivers and the sea, creating an unstable environment with daily fluctuations in several environmental factors (Yuan et al. 2011; Zhang et al. 2021). Environmental factors such as distance from the sea, tidal regime, salinity, temperature, and pH can influence the diversity of microorganisms (Crump et al. 2004; Zhang et al. 2019; Liu et al. 2020; Bahram et al. 2018; 2020). The environmental factors studied here formed a set of unique features specific to each locality where *L. racemosa* species were located along the mangrove due to the temporal and spatial heterogeneity of the ecotone. However, the yeast communities did not vary significantly between the sampled sites, indicating that the community was compositionally stable. The environmental changes can stimulate stability in the composition of microbial communities (Chen et al. 2020). Unlike the epiphytic yeast community, the yeasts present in the rhizosphere of plants have a homogeneous composition (Golubtsova et al. 2007).

The diversity of yeast communities in the rhizospheres of species of *L. racemosa* located along the river varied. Similar results were reported by Zhang et al. (2021) studying the community structure of soil microorganisms in a Chinese estuary, which reported a negative relationship between locations with more significant sea influence, and consequently greater salinity, and the diversity of microorganism groups. The different diversity in the communities of microorganisms associated with plant species of mangroves has been reported in the literature (Moitinho et al. 2019; Bezerra et al. 2022).

Plant species are crucial to determining the composition of microorganism communities. Some studies have shown that areas with plant cover composed of several plant species favor the most remarkable diversity of microorganisms (Liu et al. 2019). Other studies have verified that yeasts play an essential role in plant growth, such as *P. laurentii*, here reported at all collection points. One of the most abundant species in our study was reported as a species that acts to increase roots (Cloete et al. 2009). However, the relationship between the yeasts in the rhizosphere soil of mangrove plant species is poorly understood.

## **CONCLUSIONS**

This study presents an important data set that can serve as a basis for studies on the diversity of yeasts in mangroves. Our results provide an overview of the composition and diversity of yeasts in sediment adjacent to rhizosphere of the species *L. racemosa* in tropical mangroves in northeastern Brazil. In addition, based on the data obtained, it can be concluded that the mangrove ecosystem is quite rich, and little explored regarding the identification of yeasts. However, when studied, it was possible to verify new records of species in the marine ecosystem, revealing possible new species and bioindicator species of environmental quality. Therefore, we reaffirm the importance of further research on microorganisms present in mangroves.

## **Acknowledgments**

The authors thank for financial support and scholarship of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (numbers of grants 475378/2013-0, 408718/2013-7, 311553/2018-4, 440777/2020-8, and 312889/2021-6). The authors thank also Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio – license 75677-1).



## REFERENCES

- Allard, S. M., Costa, M. T., Bulseco, A. N., Zengler, K., Diego, S. (2020). Applied and environmental science crossm introducing the mangrove microbiome initiative: identifying microbial research priorities and approaches to better. *Applied and Environmental Science*, 5, 1–9. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00658-20>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*, 27, 3389–3402. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80418-E](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80418-E)
- Amprayn, K. O., Rose, M. T., Kecskés, M., Pereg, L., Nguyen, H. T., Kennedy, I. R. (2012). Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *Applied Soil Ecology*, 61, 295-299. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.009>
- Araujo, F. V., Hagler, A. N. (2011). *Kluyveromyces aestuarii*, a potential environmental quality indicator yeast for mangroves in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 954–958. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300014>
- Arfi, Y., Marchand, C., Wartel, M., Record, E. (2012a). Fungal diversity in anoxic-sulfidic sediments in a mangrove soil. *Fungal Ecol*, 5, 282-285. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.09.004>
- Arfi, Y., Buee, M., Marchand, C., Levasseur, A., Record, E. (2012b). Multiple markers pyrosequencing reveals highly diverse and host-specific fungal communities on the mangrove trees *Avicennia marina* and *Rhizophora stylosa*. *FEMS microbiology ecology*, 79, 433-444. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01236.x>
- Arrey, G., Li, G., Murphy, R., Guimaraes, L., Alizadeh, S., Poulsen, M., Regenber, B. (2021). Isolation, characterization, and genome assembly of *Barnettozyma botsteinii* sp. nov. and novel strains of *Kurtzmanella quercitrusa* isolated from the intestinal tract of the termite *Macrotermes bellicosus*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 11, 12. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab342>

- Babjeva I. P., Gorin S. E. (1987). Soil Yeasts. *Moscow State University Press: Moscow*.
- Bahram, M., Hildebrand, F., Forslund, S. K., Anderson, J. L., Soudzilovskaia, N. A., Bodegom, P. M., Bengtsson-Palme, J.; Anslan, S.; Coelho, L. P.; Harend, H.; Huerta-Cepas, J.; Medema, M. H.; Maltz, M. R.; Mundra, S.; Olsson, P. A.; Pent, M.; Pöhlme, S.; Sunagawa, S.; Ryberg, M.; Tedersoo, L.; Bork, P. Bork, P. (2018). Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature*, 560(7717), 233-237. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0386->
- Barbier, E., Hacker, S., Kennedy, C., Koch, E., Stier, A., Silliman, B. (2011). The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecological Monographs*, 81(2), 169–193. <https://doi.org/10.1890/10-1510.1>
- Baskaran, R., Mohan, P., Sivakumar, K., Ragavan, P., Sachithanandam, V. (2012). Phyllosphere Microbial Populations of Ten True Mangrove Species of the Andaman Island. *International Journal of Microbiological Research*, 3(26), 124–127. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2012.3.2.6221>
- Bezerra, W. M., Tavares, T. C. L., Nogueira, V. L. R., Normando, L. R. O., Bomfim, T. A., Angelim, A. L., Melo, V. M. M. (2022). Bacteriome associated with *Rhizophora mangle* sediments within brazil semi-arid mangroves. *Arquivos de Ciências do mar*, 55, 34–51. <http://dx.doi.org/10.32360/78512>
- Botha A. 2006. Yeasts in soil. In: Biodiversity and Yeast Ecophysiology. The Handbook, Rose C, Peter G. (eds.). *Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg*; 221-240. [https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3\\_11](https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_11)
- Botha, A. (2011). The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.001>
- Brandão, C. J., Botelho, M. J. C., Sato, M. I. Z. (2011). Guia nacional de coleta e preservação de amostras. CETESB - *Repositório ANA - Soluções educacionais da Agência Nacional de água*.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Van Themaat, E. V. L., Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 807–838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312->

- Buzzini, P., Lachance, M. A., Yurkov, A. (2017). Yeasts in natural ecosystems: Ecology. *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology*, 1–293. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61575-2>
- Cadete, R. M., Lopes, M. R., Rosa, C. A., (2017). Yeasts associated with decomposing plant material and rotting wood. In: Buzzini, P., Lachance, M.A., Yurkov, A. (Eds.), *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity. Springer Nature*, Switzerland, 265-292 [https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3_9)
- Chi, Z. M., Liu, T. T., Chi, Z., Liu, G. L., Wang, Z. P. (2012). Occurrence and Diversity of Yeasts in the Mangrove Ecosystems in Fujian, Guangdong and Hainan Provinces of China. *Indian Journal of Microbiology*, 52(3), 346–353. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0251-5>
- Clarke, K. R., Warwick, R. M. (1998). A taxonomic distinctness index and its statistical properties. *Journal of Applied Ecology*, 35(4), 523–531. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.1998.3540523.x>
- Clarke, K., Warwick, R. (2001). A further biodiversity index applicable to species lists: variation in taxonomic distinctness. *Marine Ecology Progress Series*, 216, 265–278. <https://doi.org/10.3354/meps216265>
- Craig, H., Kennedy, J. P., Devlin, D. J., Bardgett, R. D., Rowntree, J. K. (2020). Effects of maternal genotypic identity and genetic diversity of the red mangrove *Rhizophora* mangle on associated soil bacterial communities: A field-based experiment. *Ecology and Evolution*, 10(24), 13957–13967. <https://doi.org/10.1002/ece3.6989>
- Crump, B. C., Hopkinson, C. S., Sogin, M. L., Hobbie, J. E. (2004). Microbial Biogeography along an Estuarine Salinity Gradient: Combined Influences of Bacterial Growth and Residence Time. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1494–1505. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1494-1505.2004>
- Devadatha, B., Jones, E. B. G., Pang, K. L., Abdel-Wahab, M. A., Hyde, K. D., Sakayaroj, J., Bahkali, A. H.; Calabon, M. S. ; Sarma, V. V.; Sutreong, S., Zhang, S. N. (2021). Occurrence and geographical distribution of mangrove fungi. *Fungal*

- Diversity, 106(1), 137-227. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00468-0>
- De Araujo, F. V., Soares, C. A. G., Hagler, A. N. (1995). Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a Southeast Brazilian mangrove ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68(2), 91–99. <https://doi.org/10.1007/BF00873096>
- Dias, A. C. F., Taketani, R. G., Andreote, F. D., Luvizotto, D. M., da Silva, J. L., Nascimento, R. dos S., de Melo, I. S. (2012). Interspecific variation of the bacterial community structure in the phyllosphere of the three major plant components of mangrove forests. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(2), 653–660. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200030>
- Dixon, P. (2003). VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science*, 14(6), 927–930. <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x>
- Fang, J., Liao, S., Zhang, S., Li, L., Tan, S., Li, W. (2021). Bioresource Technology Characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification yeast , *Barnettozyma californica* K1. *Bioresource Technology*, 339, 125665. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125665>
- Félix, C. R., Andrade, D. A., Almeida, J. H., Navarro, H. M. C., Fell, J. W., Landell, M. F. (2020). Vishniacozyma alagoana sp. nov. a tremellomycetes yeast associated with plants from dry and rainfall tropical forests. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(5), 3449-3454. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004193>
- Ferreira, B. P., Maida, M. (2006). Monitoramento dos recifes de coral do Brasil. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas.
- Flechtmann, C. H. W., dos Santos-Mendonca, I. V., Almeida-Cortez, J. S. (2007). A new species of *brachendus* (acari: Eriophyidae) associated with the white mangrove, *Laguncularia racemosa* (L.) gaerten (combretaceae), in Brazil. *International Journal of Acarology*, 33(3), 195–198. <https://doi.org/10.1080/01647950708684524>
- Hagler, A. N. (2006). Yeasts as indicators of environmental quality. In Biodiversity and ecophysiology of yeasts. *Springer, Berlin, Heidelberg*, 515-532.

[https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3\\_21](https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_21)

- Hagler AN, Mendonça-Hagler LC, Pagnocca FC (2017). Yeasts in aquatic ecotone habitats. In: Buzzini P, Lachance MA, Yurkov A (eds) Yeasts in natural ecosystems: diversity. *Springer, Switzerland*, 70–74. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3_2)
- Haldar, S., Nazareth, S. W. (2019). Diversity of fungi from mangrove sediments of Goa, India, obtained by metagenomic analysis using Illumina sequencing. *3 Biotech*, 9(5), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1698-4>
- Hammer, O., Harper, D. A. T. a. T., Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1)(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.025>
- Hochard, J. P., Hamilton, S., Barbier, E. B. (2019). Mangroves shelter coastal economic activity from cyclones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(25), 12232–12237. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820067116>
- Hoondede, P., Wattanagonniyom, T., Weeraphan, T., Tanasupawat, S., Savarajara, A. (2019). Occurrence of oleaginous yeast from mangrove forest in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2680-3>
- Huang C. H., Lee F. L., Tien C. J. , Hsieh P. W. (2011). *Rhodotorula taiwanensis* sp. nov., a novel yeast species from a plant in Taiwan. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99, 297–302. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9489-2>
- Into, P., Pontes, A., Sampaio, J. P., Limtong, S. (2020). Yeast diversity associated with the phylloplane of corn plants cultivated in Thailand. *Microorganisms*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010080>
- Jang, J. E., Park, S.-J., Lee, J.-S. (2021). Isolation of Wild Yeasts and Characterization of Physiological Functionalities of Unrecorded Wild Yeasts Obtained from Flowers and Soils of the Wolpyung Park, Daejeon City and Gykpo Beach, Buan, Jeollabuk-do in Korea. *The Korean Journal of Mycology*, 49(1), 87–100.

<https://doi.org/10.4489/KJM.20210009>

- Jones, E. B. G., Suetrong, S., Sakayaroj, J., Bahkali, A. H., Abdel-wahab, M. A. (2015). Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota , Blastocladiomycota and Chytridiomycota. *Fungal Diversity*, 73, 1-72. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0339-4>
- Kandasamy, K., Alikunhi, N. M., Subramanian, M. (2012). Yeasts in marine and estuarine environments. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 3(6), 74–82. <https://doi.org/10.5897/JYFR12.003>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kunthiphun, S., Chokreansukchai, P., Hondee, P., Tanasupawat, S., Savarajara, A. (2018). Diversity and characterization of cultivable oleaginous yeasts isolated from mangrove forests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2507-7>
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73(4), 331–371. <https://doi.org/10.1023/A:1001761008817>
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J., Basehoar-Powers, E. (2008). Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Research*, 8(6), 939–954. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00419.x>
- Kutty, S. N., Philip, R. (2008). Marine yeasts—a review. *Yeast*, 25(7), 465-483. <https://doi.org/10.1002/yea.1599>
- Landell, M. F., Inácio, J., Fonseca, Á., Vainstein, M. H., Valente, P. (2009). *Cryptococcus bromeliarum* sp. nov., an orange-coloured basidiomycetous yeast isolated from bromeliads in Brazil. *International Journal of Systematic and*

- Evolutionary Microbiology*, 59(4), 910–913. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.005652-0>
- Lara, C.A., Santos, R.O., Cadete, R.M., Ferreira, C., Marques, S., Gírio, F., Oliveira, E.S., Rosa, C.A., Fonseca, C. (2014). Identification and characterization of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. *Antonie Leeuwenhoek*. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0172-x>
- Li, F. L., Zhong, L., Cheung, S. G., Wong, Y. S., Shin, P. K. S., Lei, A. P., Zhou, H. C., Song, X., Tam, N. F. Y. (2020). Is *Laguncularia racemosa* more invasive than *Sonneratia apetala* in northern Fujian, China in terms of leaf energetic cost? *Marine Pollution Bulletin*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.110897>
- Liu, Z., Zhang, C., Wei, Q., Zhang, S., Quan, Z., Li, M. (2020). Temperature and salinity drive comammox community composition in mangrove ecosystems across southeastern China. *Science of The Total Environment*, 742, 140456. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140456>
- Luo, L., Wu, R., Gu, J. D., Zhang, J., Deng, S., Zhang, Y., Wang, L., He, Y. (2018). Influence of mangrove roots on microbial abundance and coenzyme activity in sediments of a subtropical coastal mangrove ecosystem. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 132(March), 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.05.002>
- Maciel, N. O., Santos, A. R., Felix, C. R., Landell, M. F., Pagani, D. M., Pimenta, R. S., ... Rosa, C. A. (2021). *Wickerhamiella martinezcruzae* fa, sp. nov., a yeast species isolated from tropical habitats. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 71(11). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005092>
- Miranda, A. F., Nham Tran, T. L., Abramov, T., Jehalee, F., Miglani, M., Liu, Z., Rochfort, S., Gupta, A., Cheirsilp, B., Adhikari, B., Puri, M., Mouradov, A. (2020). Marine Protists and *Rhodotorula* Yeast as Bio-Convertors of Marine Waste into Nutrient-Rich Deposits for Mangrove Ecosystems. *Protist*, 171(3), 125738. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2020.125738>
- Morais, C. G., Sena, L. M., Lopes, M. R., Santos, A. R. O., Barros, K. O., Alves, C. R., ... Rosa, C. A. (2020). Production of ethanol and xylanolytic enzymes by yeasts

- inhabiting rotting wood isolated in sugarcane bagasse hydrolysate. *Fungal biology*, 124(7), 639-647. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.03.005>
- Osorio, J. A., Wing, M. J., Roux, J. (2016). A review of factors associated with decline and death of mangroves, with particular reference to fungal pathogens. *South African Journal of Botany*, 103, 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.08.010>
- Paulino. G. V. B., Félix. C. R., Broetto. L., Landell. M. F. (2017a). Diversity of culturable yeasts associated with zoanthids from Brazilian reef and its relation with anthropogenic disturbance. *Marine Pollution Bulletin*. 123(1-2). 253-260. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.050>.
- Paulino. G. V. B., Broetto. L., Pylro. V. S., Landell. M. F. (2017b). Compositional shifts in bacterial communities associated with the coral *Palythoa caribaeorum* due to anthropogenic effects. *Marine Pollution Bulletin*. 114(2). 1024-1030.
- Paulino, G. V. B., Félix, C. R., Silvan, C. G., Andersen, G. L., Landell, M. F. (2020). Bacterial community and environmental factors associated to rivers runoff and their possible impacts on coral reef conservation. *Marine pollution bulletin*, 156, 111233. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111233>.
- Prakash, A., Randhawa, H. S., Khan, Z. U., Ahmad, S., Hagen, F., Meis, J. F., Chowdhary, A. (2018). Environmental distribution of *Cryptococcus* species and some other yeast-like fungi in India. *Mycoses*, 61(5), 305-313. <https://doi.org/10.1111/myc.12741>
- R Team. (2016). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Rice, E. W.; Baird, R. B.; Eaton, A. D. (2017). *Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater*. 23. ed. S.I: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Saluja, P., Yelchuri, R. K., Sohal, S. K., Bhagat, G., Prasad, G. S. (2012). *Torulaspora indica* a novel yeast species isolated from coal mine soils. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101(4), 733-742. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9687-6>
- Sena, L.M., Morais, C.G., Lopes, M.R., Santos, R.O., Uetanabaro, A.P., Morais, P.B.,

- Vital, M.J.S., Morais Jr., M.A., Lachance, M.A., Rosa, C.A., 2017. D-Xylose fermentation, xylitol production and xylanase activities by seven new species of Sugiyamaella. Antonie van Leeuwenhoek. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0775-5>
- Simões, M. F., Antunes, A., Ottoni, C. A., Amini, M. S., Alam, I., Alzubaidy, H., Mokhtar, N. A., Archer, J. A. C., Bajic, V. B. (2015). Soil and Rhizosphere Associated Fungi in Gray Mangroves (*Avicennia marina*) from the Red Sea - A Metagenomic Approach. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 13(5), 310–320. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.07.002>
- Singh, Y. D., Singh, M. C., Panda, M. K. (2020). Biotechnological aspects of mangrove microorganisms. *Biotechnological Utilization of Mangrove Resources*, 381-398. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819532-1.00018-4>
- Staden R, Beal KF, Bonfield JK (2000) The Staden Package (1998). In: Misener S, Krawetz SA (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology™, Humana Press, Totowa, 132, 115–130. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:115>
- Starmer, W. T., Lachance, M. A. (2011). Yeast ecology. *The Yeasts*, 1, 65–83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00006-9>
- Su, C. J., Hsieh, S. Y., Chiang, M. W. L., Pang, K. L. (2020). Salinity, pH and temperature growth ranges of Halophytophthora isolates suggest their physiological adaptations to mangrove environments. *Mycology*, 11(3), 256–262. <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1714768>
- Suh, S., Blackwell, M., Kurtzman, C. P. (2017). Phylogenetics of Saccharomycetales , the ascomycete yeasts. *Mycologia*, 5514. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832629>
- Valente, P., Boekhout, T., Landell, M. F., Crestani, J., Pagnocca, F. C., Sette, L. D. D., Passarini, M. R. Z., Rosa, C. A., Brandão, L. R., Pimenta, R. S., Ribeiro, J. R. J. R., Garcia, K. M., Lee, C. F., Suh, S. O., Péter, G., Dlačny, D. D., Fell, J. W., Scorzetti, G., Theelen, B., ... Vainstein, M. H. (2012). *Bandoniozyma* gen. nov., a

- Genus of Fermentative and Non-Fermentative Tremellaceous Yeast Species. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046060>
- Velez, P., González, M. C., Rosique-Gil, E., Cifuentes, J., Reyes-Montes, M. del R., Capello-García, S., Hanlin, R. T. (2013). Community structure and diversity of marine ascomycetes from coastal beaches of the southern Gulf of Mexico. *Fungal Ecology*, 6(6), 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.10.002>
- Yuan, L. R., Xin, P., Kong, J., Li, L., Lockington, D. (2011). A coupled model for simulating surface water and groundwater interactions in coastal wetlands. *Hydrological Processes*, 25(23), 3533–3546. <https://doi.org/10.1002/hyp.8079>
- Yurkov, A. M. (2018). Yeasts of the soil – obscure but precious. *Yeast*, 35(5), 369–378. <https://doi.org/10.1002/yea.3310>
- Wang X, Chi Z, Yue L, Li J (2007) A marine killer yeast against the pathogenic yeast strain in crab (*Portunus trituberculatus*) and an optimization of the toxin production. *Microbiological Research*, 162, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.09.002>
- Zhang, K., Shi, Y., Cui, X., Yue, P., Li, K., Liu, X., ... Chu, H. (2019). Salinity is a key determinant for soil microbial communities in a desert ecosystem. *MSystems*, 4(1), e00225-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00225-18>
- Zhang, G., Bai, J., Tebbe, C. C., Zhao, Q., Jia, J., Wang, W., Wang, X., Yu, L. (2021). Salinity controls soil microbial community structure and function in coastal estuarine wetlands. *Environmental Microbiology*, 23(2), 1020–1037. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15281>

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos do sedimento e da água do Manguezal da Barra de Santo Antônio**

No geral, todos os parâmetros físico-químicos (pH da água, temperatura da água, oxigênio dissolvido, condutividade, clorofila, salinidade e condutividade) aumentaram discretamente, em direção ao mar (Tabela 1). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros físico-químicos do sedimento e da água nos pontos amostrados, nem entre os anos de amostragem. Krumme *et al.*, (2012) em seu estudo em um manguezal no sul da China também verificou esse aumento em relação à alguns parâmetros físico-químicos (salinidade, OD e pH) em direção a costa, e também constatou que há uma oscilação de alguns parâmetros associando essas mudanças ao regime de maré e associou esse efeito ao regime de marés e o período do dia (início ou final da manhã ou da tarde) em que ocorre a aferição dos parâmetros. De fato, a padronização das condições no dia da coleta, como regime de marés e do horário da coleta, são cruciais para não haver muita discrepância nos parâmetros, aqui padronizamos esses dois fatores e esse cuidado se reflete em nossos resultados.

**Tabela 1:** Valores obtidos para os parâmetros físico-químicos da água e do sedimento em três pontos amostrais: Ponto 01, Ponto 02 e Ponto 03, durante os dois anos de coleta no manguezal do Rio Santo Antônio no Nordeste do Brasil.

| Data da coleta | Amostra | Temperatura da água (°C) | Temperatura do solo (°C) | pH da água | pH do solo | Salinidade (ppm) | Condutividade (mS/cm) | O.D (%) | Turbidez (NTU) | Clorofila (g/L) |
|----------------|---------|--------------------------|--------------------------|------------|------------|------------------|-----------------------|---------|----------------|-----------------|
| 14/03/2020     | Ponto 1 | 29,39                    | 29,00                    | 8,92       | 6,0        | 20,48            | 32,92                 | 0,0     | 18,20          | 0,00            |
|                | Ponto 2 | 29,92                    | 29,00                    | 7,55       | 5,0        | 12,98            | 21,75                 | 68,5    | 23,60          | 6,40            |
|                | Ponto 3 | 30,15                    | 28,00                    | 7,63       | 4,5        | 2,23             | 4,23                  | 16,3    | 0,00           | 11,10           |
| 30/10/2020     | Ponto 1 | 28,94                    | 28,00                    | 7,94       | 3,5        | 1,43             | 29,89                 | 29,3    | 9,10           | 1,10            |
|                | Ponto 2 | 28,60                    | 28,00                    | 7,91       | 5,0        | 0,60             | 12,95                 | 11,5    | 1,50           | 8,00            |
|                | Ponto 3 | 28,40                    | 28,00                    | 7,98       | 5,0        | 0,00             | 4,00                  | 16,0    | 15,70          | 2,70            |
| 01/03/2021     | Ponto 1 | 29,89                    | 28,00                    | 6,23       | 6,5        | 18,35            | 29,86                 | 65,9    | 7,70           | 8,30            |
|                | Ponto 2 | 29,16                    | 28,00                    | 6,36       | 5,0        | 12,96            | 29,16                 | 53,1    | 6,40           | 7,00            |
|                | Ponto 3 | 29,07                    | 28,00                    | 6,46       | 4,0        | 4,77             | 29,07                 | 48,7    | 1,50           | 3,30            |
| 10/08/2021     | Ponto 1 | 25,38                    | 25,00                    | 7,38       | 4,0        | 0,18             | 0,20                  | 72,3    | 44,00          | 0,30            |
|                | Ponto 2 | 26,86                    | 26,00                    | 7,19       | 6,0        | 0,11             | 0,60                  | 56,8    | 92,00          | 1,70            |
|                | Ponto 3 | 24,90                    | 25,00                    | 6,96       | 4,5        | 4,50             | 0,23                  | 65,5    | 42,80          | 1,30            |

## Coliformes

Com relação aos parâmetros microbiológicos, obtivemos os valores referentes a quantificação do teste presuntivo de coliformes totais e coliforme termotolerantes nas amostras de água e do sedimento. Ao analisarmos nossos resultados foi possível verificar que todos os pontos apresentaram níveis elevados de coliformes totais e coliformes termotolerantes (Tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos por Paulino *et al.*, (2017a).

**Tabela 2.** Valores obtidos para os parâmetros microbiológicos da água e do sedimento em três pontos amostrais: Ponto 01, Ponto 02 e Ponto 03, no manguezal do rio Santo Antônio no Nordeste do Brasil.

| Data da coleta | Ponto de amostragem | Coliformes Totais (MPN) |           |
|----------------|---------------------|-------------------------|-----------|
|                |                     | Água                    | Sedimento |
| 14/03/2020     | Ponto 1             | 16000                   | 9200      |
|                | Ponto 2             | >16000                  | >16000    |
|                | Ponto 3             | 16000                   | 16000     |
| 30/10/2020     | Ponto 1             | >16000                  | >16000    |
|                | Ponto 2             | >16000                  | >16000    |
|                | Ponto 3             | >16000                  | >16000    |
| 01/03/2021     | Ponto 1             | 9200                    | 5100      |
|                | Ponto 2             | 2200                    | 9200      |
|                | Ponto 3             | 9200                    | 9200      |
| 10/08/2021     | Ponto 1             | >16000                  | >16000    |
|                | Ponto 2             | >16000                  | >16000    |
|                | Ponto 3             | >16000                  | >16000    |

## Coliformes

Com relação à análise microbiológica de coliformes, os resultados indicaram a presença de coliformes totais e termotolerantes na água e no sedimento de todos os

pontos de amostragem. A partir da utilização da técnica de NMP foi possível evidenciar que todas as amostras foram positivas e que estão acima do valor de referência estabelecido pela Resolução CONAMA 357/05. Alguns fatores podem influenciar os níveis de coliformes como pluviosidade (SILVA 2020) e interferência antrópica como contaminação por rejeitos domésticos e agrícolas (GARBOSSA *et al.*, 2017). Apesar dos fatores ambientais dos manguezais, algumas cepas de *E. coli*, por exemplo, as contaminações, principalmente, por despejos domésticos fazem com que esse grupo de microrganismo prospere nesses ecossistemas, trazendo prejuízos à qualidade ambiental e saúde humana (Jang *et al.*, 2017).

As leveduras são encontradas em diversos ambientes. Existem leveduras que sobrevivem e preferem ambientes ricos em açúcares, algumas são mais adaptadas a ambientes salinos e outras são mais adaptadas a substratos alcalinos e têm preferência por condições mais ácidas (PAULA *et al.*, 1983). Em nosso estudo foi possível perceber que as espécies que permaneceram compondo a comunidade de leveduras em todos os pontos possivelmente conseguem tolerar uma ampla faixa de salinidade, além de outros fatores que podem ter contribuído para a permanência dessa espécie ao longo dos pontos, como por exemplo relações simbióticas com a espécie vegetal.

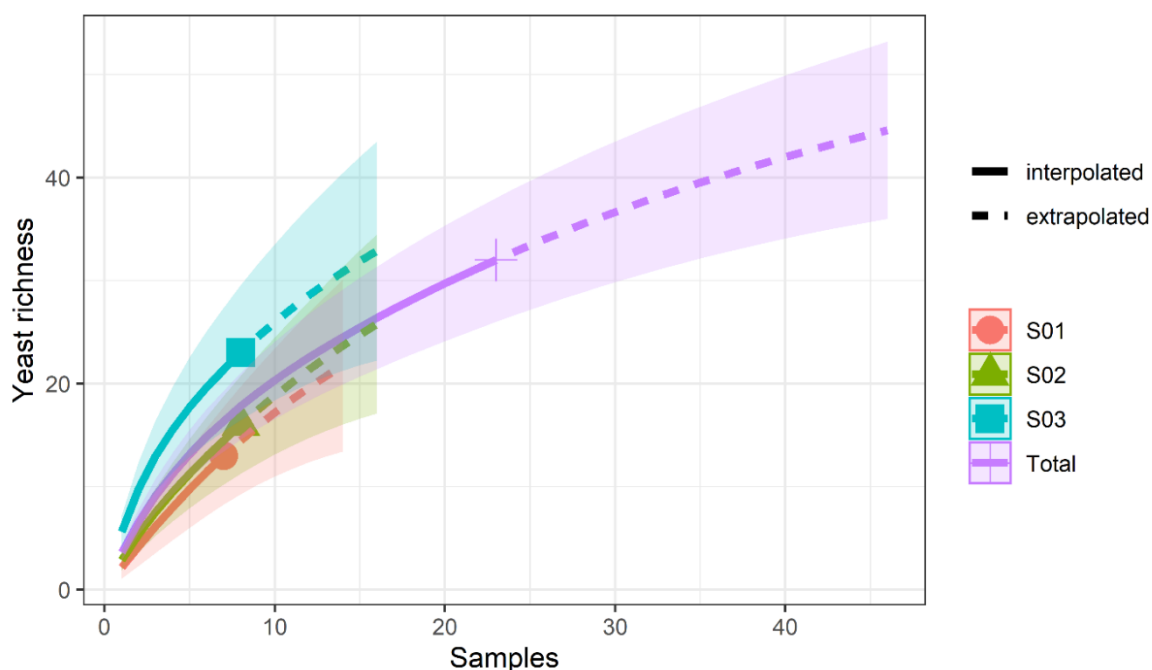
## **6.2. Riqueza e diversidade de leveduras**

Um total de 24 amostras foram coletadas de sedimentos rizosféricos próximos a espécie *L. racemosa* no manguezal do rio Santo Antônio. Destas amostras, obtivemos 132 isolados pertencentes a 32 espécies de leveduras e fungos leveduriformes. Dessas espécies, 69% pertencem ao filo Ascomycota e 31% ao filo Basidiomycota, agrupadas em 18 gêneros, e distribuídas entre os pontos 01 (n = 26), ponto 02 (n = 29) e ponto 03 (n = 77).

Entre todas as amostras coletadas, a maior riqueza foi encontrada em uma única amostra onde obtivemos onze espécies, no ponto 03. Este é o ponto que recebe menor influência da maré e conseqüentemente menor salinidade. Corroborando com nossos

achados, Luís *et al.*, (2019) em seus estudos verificaram que a salinidade e outros fatores como cobertura vegetal, pluviosidade e profundidade do solo podem influenciar a diversidade de fungos. Quando analisamos a curva de rarefação verificamos que não foi atingida a assíntota indicando que a riqueza nos locais amostrados é ainda maior do que o amostrado (Figura 4).

**Figura 4.** Curva de rarefação-extrapolação das espécies nos três pontos amostrais e no total dos dados agrupados.



Nossos resultados revelaram uma diversidade semelhante a trabalhos desenvolvidos em manguezais de outros países, como o estudo desenvolvido por Hoondée *et al.*, (2019), que ao estudar uma floresta de mangue na Tailândia obtiveram uma diversidade de 32 espécies agrupadas em 16 gêneros. Em estudos desenvolvidos em ambientes tropicais com amostras provenientes do solo, a diversidade de fungos é maior, e se comparada a outros ambientes mais distantes dos trópicos, a diversidade de fungos tende a diminuir (TEDERSO *et al.*, 2014). Como os estudos de Ahmed *et al.*, (2019) desenvolvido em um manguezal no Paquistão que obtiveram 05 espécies de

leveduras, são elas *Candida parapsilosis*, *Debaryomyces fabryii*, *Debaryomyces hansenii*, *S. cerevisiae*, e *Schizosaccharomyces pombe*.

*Candida* foi o gênero mais prevalente e com maior diversidade de espécies, em comparação com os demais gêneros encontrados. Esse gênero é frequentemente isolado de ambientes aquáticos e florestais, comumente relatado em diversos manguezais do mundo, como na Flórida, na Tailândia e no Rio de Janeiro (Hagler 2007, Hagler e Mendonça 2011, Kunthiphun *et al.*, 2018). Geralmente a presença de algumas espécies desse gênero estão relacionadas a poluição do corpo hídrico ou do sedimento por dejetos humanos ou de aves (Hurley *et al.*, 1987). Além disso, a presença de *Candida* spp. em manguezais pode estar associada a outros fatores, como a presença de matéria orgânica (Kutty *et al.*, 2014), e pode estar relacionada à capacidade de algumas espécies do gênero sobreviverem em um ambiente com variações constantes em fatores ambientais (Kandasamy 2012).

### **6.3. Abundância das espécies de Levedura isoladas**

A espécie *C. tropicalis* ocorreu em 45,8% das amostras, seguida por *Candida* (*Pichia*) *pseudolambica* e *P. laurentii* com 33,3%, *Torulaspora indica*, *Candida ghanaensis* e *Pichia manshurica* com 20,8%. As demais espécies ocorreram em menos de 13% das amostras e foram consideradas espécies com frequência baixa ou ocasional.

Resultados semelhantes foram obtidos em estudos realizados em quatro manguezais na Tailândia, onde as espécies *C. tropicalis* e *C. pseudolambica* também foram prevalentes (Kunthiphun *et al.*, 2018). A espécie *C. tropicalis* é comumente isolada de plantas e é capaz de promover o crescimento de espécies vegetais por meio da produção de ácido indol acético (Amprayn *et al.*, 2012). Entretanto, essa espécie também é considerada frequente em sedimentos poluídos (Hagler *et al.*, 1982). *C. tropicalis* é relatada no grupo de patógenos humanos (Wang *et al.*, 2007), mas é

frequentemente isolado de manguezais (Chi *et al.*, 2012; Hagler *et al.*, 2017), sugerindo uma relação com a qualidade ambiental (Hagler 2006; Starmer Lachance 2011).

Em contrapartida, vale a pena ressaltar a presença da espécie *K. aestuarii* que apresenta uma estreita relação com os manguezais. Ahearn *et al.*, (1968) em seu estudo em manguezais relatou que essa espécie pode ser isolada de invertebrados, espécies vegetais de mangue e sedimento, como as espécies encontradas em nosso estudo. Entretanto, apesar dessa espécie ser indicadora de qualidade ambiental, contagens altas de coliformes não determinam a sua distribuição (Araujo & Hagle 2011). Aqui, encontramos o mesmo padrão, pois a espécie *K. aestuarii* estava presente em todos os pontos de amostragens que apresentaram contagens elevadas de coliformes.

Como ocorre a distribuição dos fungos em manguezais ainda é um assunto pouco compreendido. O que se sabe é que são encontradas em diversos substratos. Devadatha *et al.* (2021) em seu trabalho de revisão bibliográfica sobre fungos de mangue relataram que a maioria dos isolados obtidos em diversos estudos em manguezais foram obtidos de madeira em decomposição (395 espécies), solos e sedimentos (193 espécies), palmeiras (95 espécies), água (96 espécies), folhas recém caídas e em estágio de decomposição (81 espécies) valores menores foram obtidos de outros substratos (Amend *et al.*, 2012). Nosso estudo soma ao quantitativo de espécies de fungos obtidos de sedimentos de manguezais, pois encontramos 12 espécies nunca registradas em manguezais, são elas *Candida ghanaensis*, *Candida sojae*, *Cyberlindnera subsufficiens*, *Kazachstania kunashirensis*, *P. manshurica*, *Rhodotorula taiwanensis*, *Rhynchogastrea noutii*, *Saitozyma cassiae*, *T. indica*, *Vishniacozyma alagoana*, *Vishniacozyma taibaiensis*, *Wickerhamiella martinezcruzae* e uma possível espécie nova, *Barnettozyma* sp.

O isolado LS115 pertence ao gênero *Barnettozyma* e foi designado como uma possível nova espécie. Este gênero foi sugerido por Kurtzman e colaboradores (2008) para agrupar espécies dos gêneros *Candida*, *Pichia* e *Williopsis* que estavam dispersos

entre os táxons. Espécies deste gênero foram recentemente relatadas como tendo funções que sugerem uma estreita relação com espécies de plantas. Arrey *et al.*, (2021), em seu estudo realizado na África, descreveu uma nova espécie deste gênero isolada do trato intestinal de cupins, e verificou que esta espécie é um degradador de polímeros derivados de espécies vegetais. Fang *et al.* (2021), na China, demonstraram que uma espécie do gênero *Barnettozyma* apresentou capacidade eficiente de nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbia. Esses processos ocorrem principalmente em solos ácidos ou salinos (Yokoyama *et al.*, 2012), como manguezais.

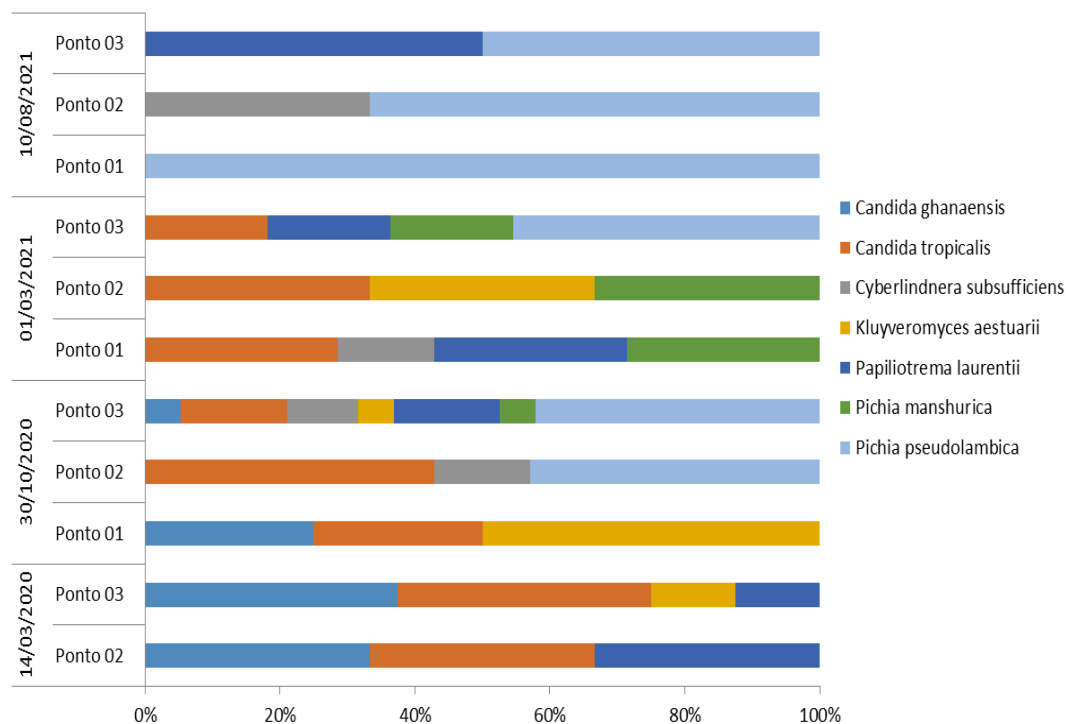
Quando levamos em consideração a abundância, menos de 20% das espécies relatadas apresentam média acima de  $10^3$  CFU/g. Algumas espécies obtiveram maior abundância média nas amostras, são elas *Lodderomyces elongisporus*  $5 \times 10^3$ , *Kluyveromyces aestuarii*, *Candida (Pichia) pseudolambica* e *Pichia occidentalis* todas com  $2 \times 10^3$ , todas as espécies já foram descritas em manguezais.

#### 6.4. Índices de diversidade

O ponto de coleta mais distante do mar (ponto 03) apresentou uma riqueza maior de espécies ( $n = 23$ ) em relação aos dois pontos mais próximos ao mar (ponto 01 e ponto 02) que apresentaram riqueza menor ( $n = 13$  e  $n = 16$ , respectivamente). Os índices de diversidade de Shannon ( $H'$ ), AvTD e TTD, apresentaram o mesmo padrão da riqueza de espécies onde a diversidade taxonômica e filogenética foi aumentando à medida em que os pontos se afastam da influência do mar, ponto 01 ( $H' = 0,305$ ; AvTD = 14,7; TTD = 84,5); ponto 02 ( $H' = 0,498$ ; AvTD = 31,7; TTD = 185,0); e ponto 03 ( $H' = 1,180$ ; AvTD = 44,0; TTD = 401,9). Em comparação com valores de dominância foi possível observar que seguiram o caminho inverso, aumentado à dominância de alguns grupos nos pontos mais próximos ao mar, passando de 0,39 no ponto 03, para 0,54 no ponto 02, e 0,64 no ponto 01.

Além das métricas de diversidade e dominância, foi avaliada a composição de espécies de leveduras nos sedimentos amostrados, e verificamos que a composição da comunidade entre os pontos não variou significativamente ( $p>0,05$ ). Mantendo uma composição constante das seguintes espécies: *C. ghanaensis*, *C. tropicalis*, *C. subsufficiens*, *K. aestuarii*, *P. laurentii*, *P. manshurica* e *C. pseudolambica*. Para exemplificar, foi elaborado um gráfico comparando as espécies que se mantiveram na composição da comunidade (Figura 5), durante as 4 coletas em cada ponto de amostragem nos anos de 2020 e 2021, totalizando 24 amostras.

**Figura 5.** Datas de coleta e a frequência de ocorrência das espécies que se mantiveram em todos os pontos de amostragem compondo a comunidade que se manteve durante os pontos de amostragem de leveduras no manguezal do rio Santo Antônio. A numeração dos pontos obedecem a uma ordem crescente com relação a distância do mar, portanto Ponto 01 é o ponto mais perto do mar, Ponto 02 o ponto intermediário, e Ponto 03 é o que tem maior distanciamento do mar.



Fonte: autor.

As espécies que fizeram parte da composição estável de leveduras variaram com relação à frequência de ocorrência nos pontos de amostragem. A amostra mais diversa que obteve a presença de todas as espécies ocorreu na segunda coleta de 2020 no ponto 03. Vale à pena ressaltar que na primeira coleta do ano de 2020 no ponto 01 não houve a presença de nenhuma das espécies mais frequentes, entretanto nas amostragens dos demais pontos pelo menos uma das espécies ocorreu.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados corroboram os sedimentos de manguezais como um ambiente rico, diverso, e que abriga espécies mais adaptadas às condições ambientais desse ecossistema, apresentando uma que se manteve durante dos pontos de coleta. Foi

verificado que a diversidade taxonômica e filogenética foi representativa principalmente no ponto mais distante do mar, indicando uma relação com o regime de maré. Percebemos ainda que há uma variação entre as espécies de leveduras isoladas da mesma espécie de mangue *L. racemosa*, indicando a importância da localização espacial das espécies. Esse estudo forneceu dados valiosos sobre a ocorrência e diversidade de leveduras em sedimentos de manguezais no Brasil, além de possibilitar o engajamento de novos estudos de biodiversidade, ecologia e conservação de micro-organismos, para melhor compreensão da dinâmica da comunidade microbiana de manguezais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-WAHAB, M. A. Diversity of marine fungi from Egyptian Red Sea mangroves. **Botanica Marina**, Berlin, v. 48, p. 348-355, 2005.
- AHMED, I. *et al.* Occurrence and biodiversity of marine yeast in mangrove ecosystem of Shabi Creek, Gwadar-Pakistan. **Pure and Applied Biology**, 2019.
- ALLOWAY, B. J. *et al.* Soil processes and the behaviour of metals. **Heavy metals in soils**, p.7-28, 1990.
- ALONGI, D. M. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. **Microbial ecology**. New York NY, v.15, n.1, p.59-79, 1988.
- ALONGI, D. M. Impact of global change on nutrient dynamics in mangrove forests. **Forests**, v.9, n.10, p.596, 2018.
- BAIRD, R. B. *et al.* (Ed.). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, DC: **American Public Health Association**, 2017.
- BEHERA, B. C. *et al.* Microbial cellulases–Diversity biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.15, n.1, p.197-210, 2017.
- BRYAN-BROWN, D. N. *et al.* Global trends in mangrove forest fragmentation. **Scientific Reports**, v.10, n.1, p.1-8, 2020.
- CAIAFA, A. N. *et al.* (Ed). CO<sub>2</sub> Manguezal - Estudos Científicos. **Petrobrás**, Bahia, 2020.
- CETESB, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Guia Nacional de Coletas e Preservação de Amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. Organizadores: Carlos Jesus Brandão *et al.* **CETESB: ANA**, São Paulo, 2011.

CHI, Z. M.; LIU, T. T.; CHI, Z.; LIU, G. L.; WANG, Z. P. Occurrence and diversity of yeasts in the mangrove ecosystems in Fujian, Guangdong and Hainan provinces of China. **Indian journal of microbiology**, p.346-353, 2012.

CLARK, F. E. Agar-plate method for total microbial count. **Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties**, v. 9, p. 1460-1466, 1965.

CLARKE, K., WARWICK, R. A taxonomic distinctness index and its statistical properties. *Journal of Applied Ecology*, v.35(4), p.523–531, 1998.

CLARKE, K., WARWICK, R. A further biodiversity index applicable to species lists: variation in taxonomic distinctness. **Marine Ecology Progress Series**, v.216, p.265–278, 2001.

COUTINHO, I. B. L. *et al.* Diversity Of Genus *Lasiodiplodia* Associated With Perennial Tropical Fruit Plants In Northeastern Brazil. **Plant Pathology**, 2016.

CURNICK, D. *et al.* The value of small mangrove patches. **Science**, v.363, n.424, p.239, 2019.

DAS, S.; LYLA, P. S.; KHAN, A. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. **Current Science**, Bangalore, v.90, p.1325-1334, 2006.

DIXON, P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. **Journal of Vegetation Science**, v.14(6), p.927–930, 2003.

FAO - Food and agriculture organization of the United Nations. the world's mangroves – 1980-2005. **FAO Forestry Paper**, p.77, 2007.

FASANELLA, C. C. *et al.* The selection exerted by oil contamination on mangrove fungal communities. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, n.7, p.4233-4243, 2012.

FERREIRA, A. C.; LACERDA, L. D. Degradation and conservation of Brazilian mangroves, status and perspectives. **Ocean Coastal Management**, 125: 38–46, 2016.

FREIRE, F. C. O.; VASCONCELOS, F. R.; COUTINHO, I. B. L. Fungos endofíticos: uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade. **Essentia**, v.16, n.1, p.61-102, 2014.

GASPARINETTI, P. *et al.* Os valores dos serviços ecossistêmicos dos manguezais brasileiros, instrumentos econômicos para a sua conservação e o estudo de caso do Salgado Paraense. **Conservation Strategy Fund**, 2018.

GHIZELINI, A. M.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; MACRAE, A. Microbial diversity in Brazilian mangrove sediments: a mini review. **Brazilian Journal of Microbiology**, p.1242-1254, 2012.

HUXHAM, M. *et al.* Kropotkin's Garden Facilitation in Mangrove Ecosystems. In: HAWKINS, S. *et al.* (Eds.). Interactions in the Marine Benthos. **Global Patterns and Processes**. Cambridge University Press. United Kingdom, p.431-447, 2019.

IMCHEN, M. *et al.* Microbial Biomolecules. **Microbial Control of Vector-Borne Diseases**, 2018.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE – ICMBIO. Plano de Manejo Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais. **Ministério do Meio Ambiente**, Brasília, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO FLORESTAL. Código Florestal Brasileiro. **Ministério da Agricultura**. Brasília, Brazil v.4771, 2001.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE – ICMBIO. Atlas dos Manguezais do Brasil. **Ministério do Meio Ambiente**, Brasília, p. 176, 2018.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of Mangroves and Mangrove Ecosystems: Advance. **Marine Biology**, v.40, p.81-251, 2001.

KATHIRESAN, K. Importance of mangrove ecosystem. **International Journal of Marine Science**, v.2, n.10, 2012.

KERRY, R. G.; DAS, G.; PATRA, J. K. Biodiversity and conservation of Mangrove ecosystem around the World. **Journal of biodiversity and conservation**, p.9-10, 2017.

KOMIYAMA, A.; ONG, J. E.; POUNGPARN, S. Allometry, biomass, and productivity of mangrove forests: A review. **Aquatic Botany**, v.89, n. 2, p.128-137, 2008.

KRISTENSEN, *et al.* Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: A review. **Aquatic Botany**, New York, v.89, p.201-219, 2008.

KUSUMANINGTYAS, M. A. *et al.* Variability in the organic carbon stocks, sources, and accumulation rates of Indonesian mangrove ecosystems. **Estuarine, Coastal And Shelf Science**, v.218, p.310-323, 2019.

KUTTY, S. N.; PHILIP, R. Marine yeasts—a review. **Yeast**, v.25, n.7, p.465-483, 2008.

LACERDA, L. D. Manguezais: Florestas de beira-mar. **Ciências Hoje**, v.3, n.13, p.63-70, 1984.

LEÃO, A. R.; PRATES, A. P. L.; FUMI, M. Manguezal e as unidades de conservação. INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE-ICMBio (Ed.). Atlas dos manguezais do Brasil. **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade-ICMBio**, Brasília, p.56-73, 2018.

LI, Y. *et al.* Comparative metagenomics study reveals pollution induced changes of microbial genes in mangrove sediments. **Scientific Reports**, v.9, n.1, p.1, 2019.

LUO, L. *et al.* Influence of mangrove roots on microbial abundance and coenzyme activity in sediments of a subtropical coastal mangrove ecosystem. **International Biodeterioration; Biodegradation**, v.132, p.10-17, 2018.

MASON, O. U. *et al.* Metagenomics reveals sediment microbial community response to Deepwater Horizon oil spill. **The ISME Journal**, v.8, n.7, p.1464-1475, 2014.

MCNEAR JUNIOR, D. H. The rhizosphere-roots, soil and everything in between. **Nature Education Knowledge**, v.4, n.3, p.1, 2013.

MEJÍA-RENTERÍA, J. C. *et al.* A comparison of Colombian Pacific mangrove extent estimations: Implications for the conservation of a unique Neotropical tidal forest. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v.212, p.233-240, 2018.

MONAPATHI, M. E.; BEZUIDENHOUT, C. C.; & JAMES RHODE, O. H. Aquatic yeasts: diversity, characteristics and potential health implications. **Journal of Water and Health**, v.18, p. 91-105, 2020.

MUNIZ, C. R. *et al.* The ultrastructure of shelled and unshelled cashew nuts. **Micron**, v.54-55, p.52-56, 2013.

NOVA, F. V. P.; TORRES, M. F. A.; COELHO, M. P. Composição físico-química de solos em espécies arbóreas do ecossistema manguezal. **ACTA Geográfica: Boa Vista**, v.11, n.27, p. 1-19. 2017.

OSORIO, J. A.; WINGFIELD, M. J.; ROUX, J. A review of factors associated with decline and death of mangroves, with particular reference to fungal pathogens. **South African Journal Of Botany**, v.103, p.295-301, 2016.

OSORIO J. A. *et al.* Endophytic Botryosphaeriaceae, including five new species, associated with mangrove trees in South Africa. **Fungal Biology**, 2016.

APA COSTA DOS CORAIS. Panorama do território, atuação do ICMBio na região e viabilidade econômica e jurídica do modelo de PAPP 2017. 2018

PAULINO, G. V. B. *et al.* Bacterial community and environmental factors associated to rivers runoff and their possible impacts on coral reef conservation. **Marine pollution bulletin**, v.156, p.111233, 2020.

R Team. R: A language and environment for statistical computing. **Vienna: R Foundation for Statistical Computing**, 2016.

SIMÕES, M. F. *et al.* Soil and Rhizosphere Associated Fungi in Gray Mangroves (*Avicennia marina*) from the Red Sea — A Metagenomic Approach. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v.13, p.310–320, 2015.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; LACERDA, L. D. de. Lagoas costeiras, manguezais, marismas, dunas e restingas. In: PANITZ, C.M.N. (Coord.). Diagnóstico ambiental oceânico e costeiro das regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Fundespa; Iusp; Petrobrás**, p. 128-347, 1994.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. **Caribbean Ecological Research**, v.7, 1995.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN, G. Guia para estudo de áreas de manguezal. Estrutura, função e flora. **Caribbean Ecological Research**, 1986.

SCHAEFFER-NOVELLI Y.; CINTRÓN-MOLERO G.; ADAIME R. R. Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian coast. **Estuaries**, v.13, p.204-218, 1990.

SOUZA, C. A. *et al.* Biodiversidade e conservação dos manguezais: importância bioecológica e econômica. Educação Ambiental sobre Manguezais. São Vicente: **Unesp**, p.16-56, 2018.

SPARLING, G. P. Soil microbial biomass, activity and nutrient cycling as indicators of soil health. **Biological indicators of soil health**, p.97-119, 1997.

STARMER, W. T.; LACHANCE, M. A. Yeast ecology. In: **The yeasts**. Elsevier, p.65-83, 2011.

SU, C. J. *et al.* Salinity, pH and temperature growth ranges of *Halophytophthora* isolates suggest their physiological adaptations to mangrove environments. **Mycology**, p.1-7, 2020.

THATOI, H.; BEHERA, B. C.; MISHRA, R. R. Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: a review. **Mycology**, v.4, p.54–71, 2013.

TOMLINSON, P. B. The Botany of Mangroves. 1. ed. **New York: Cambridge University Press**, p.170, 1986.

TOMLINSON, P. B. The Botany of Mangroves. 2. ed. **Cambridge: Cambridge University Press**, 2016.

USEPA, Eds. Decision Documents for Atrazine: Finalization of Interim Registration Eligibility Decision and Completion of Tolerance Reassessment and Reregistration Eligibility Process. 2006.

VALIELA, I.; BOWEN, J. L.; YORK, J. K. Mangrove Forests: One of the World's Threatened Major Tropical Environments: At least 35% of the area of mangrove forests has been lost in the past two decades, losses that exceed those for tropical rain forests and coral reefs, two other well-known threatened environments. **Bioscience**, v.51, n.10, p.807-815, 2001.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass-c. **Soil Biology; Biochemistry**, v.19, n.6, p.703-707, 1987.

VANNUCCI, M. *et al.* The mangroves and us: a synthesis of insights. **The mangroves and us: a synthesis of insights.**, 1989.