



**MARINHA DO BRASIL
INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MARINHA**

TALITA ALVES MENENGAT

**CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO NO MANGUE DE PEDRA BÚZIOS-RJ**

ARRAIAL DO CABO/RJ 2024



**MARINHA DO BRASIL
INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MARINHA**

TALITA ALVES MENENGAT

**CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO NO MANGUE DE PEDRA BÚZIOS-RJ**

Dissertação apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e à Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Marinha.

Orientador: Dr. Ricardo Coutinho

Co-orientadora: Dr^a. Lorena da Graça
Pedrosa de Macena

ARRAIAL DO CABO/RJ 2024

**CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO NO MANGUE DE PEDRA, BÚZIOS-RJ**

Dissertação apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e a Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do título e Mestre em Biotecnologia Marinha.

COMISSÃO JULGADORA:

Dr. Ricardo Coutinho
Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira
Professor Orientador – Presidente da Banca Examinadora

Dr. Ocimar Ferreira de Andrade
Instituto Federal Fluminense - Campus Cabo Frio-RJ
(Examinador Externo)

Dr^a. Rafaela Camargo Maia
Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Ceará, Acaraú, Brasil
(Examinador Externo)

Dr. Sávio Henrique Calazans Campos
Instituto de Estudo do Mar Almirante Paulo Moreira
(Examinador Interno)

Dr^a. Maria Helena Baeta Neves
Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira
(Examinador Interno)

Dr^a Júlia da Luz Bueno
Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira
(Suplente)

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV
Gerada com informações fornecidas pelo autor

M542c Menengat, Talita Alves
CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO NO MANGUE DE PEDRA BÚZIOS-RJ / Talita Alves
Menengat. - 2024.
102 f.

Orientador: Ricardo Coutinho.
Coorientador: Lorena da Graça Pedrosa De Macena.
Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Instituto de Biologia, Niterói, 2024.

1. Bactérias. Fungos micorrízicos arbuscular. 2.
Rizosfera. 3. Caracterização Molecular. 4. Potencial
biotecnológico.. 5. Produção intelectual. I. Coutinho,
Ricardo, orientador. II. De Macena, Lorena da Graça Pedrosa,
coorientador. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto
de Biologia. IV. Título.

CDD - XXX

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368



MARINHA DO BRASIL
INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA - IEAPM
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE - UFF
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MARINHA - PPGBM

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 60

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM BIOTECNOLOGIA MARINHA

Ao décimo sétimo dia do mês de julho do ano de dois mil e vinte e quatro, às nove horas, pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha, em Arraial do Cabo - RJ realizou-se, de forma remota, a prova de Defesa de Dissertação, intitulada: "Identificação de microrganismos com potencial biotecnológico no manguezal de Pedra Búzios" de autoria da mestranda **Talita Alves Menengat**, aluna do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha, em nível de Mestrado. A Banca Examinadora esteve constituída pelos professores: Dr. Ricardo Coutinho – Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) – Presidente, Dra. Maria Helena Campos Baeta Neves – Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) – Membro Interno, Dr. Sávio Henrique Calazans Campos – Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) – Membro Interno, Dra. Rafaela Camargo Maia – Instituto Federal do Ceará (IFCE) – Membro Externo, Dr. Ocimar Ferreira de Andrade – Instituto Federal Fluminense (IFF) – Membro Externo, Dra. Júlia da Luz Bueno – Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) – Suplente. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, a candidata foi aprovada pela Banca Examinadora. Foi concedido um prazo de 30 dias para a candidata efetuar as correções sugeridas pela Banca Examinadora, apresentar o trabalho em sua redação definitiva, atender ao requisito de publicação estabelecido nas normas do PPGBM e entregar a documentação necessária para a elaboração do Diploma. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca e pela candidata.

Dr. Ricardo Coutinho (IEAPM)

Dra. Maria Helena Campos Baeta Neves (IEAPM)

Dr. Sávio Henrique Calazans Campos (IEAPM)

gov.br Documento assinado digitalmente
RAFAELA CAMARGO MAIA
Data: 06/07/2024 17:45:49 (GMT)
Verifique em: https://validar.br.gov.br

Dra. Rafaela Camargo Maia (IFCE)

Dr. Ocimar Ferreira de Andrade (IFF)

Dra. Dra. Júlia da Luz Bueno (IEAPM)

gov.br Documento assinado digitalmente
JULIA DA LUZ BUENO
Data: 23/07/2024 18:48:54 (GMT)
Verifique em: https://validar.br.gov.br

Assinatura da Candidata:

Av. Luiz Correia, 08 - Prédio Amazônia Azul.

Praia dos Anjos - Arraial do Cabo - RJ - CEP: 28.930-000
TEL.: (22) 2622-9020

Dedico esta dissertação a minha mãe e *in memoriam* aos meus eternos queridos pai e irmão.

“Eu sou o Alfa e o Ômega, o Princípio e o Fim. Somente a Deus toda Honra e toda Glória, para todo sempre, Amém”!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me conceder oportunidades em conhecer suas obras e maravilhas pela ciência e direcionar pessoas especiais que contribuíram neste trabalho. Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM-UFF), pela infraestrutura, apoio técnico-administrativo e todo corpo docente. Iniciando pela minha querida co-orientadora Dr^a Lorena da Graça Pedrosa de Macena, um ser humano incrível, direcionada por Deus, que me acolheu e ensinou com toda paciência e dedicação, sua experiência de alto nível em biologia molecular e microbiologia, onde sem seu apoio nada disso seria possível para realização deste trabalho. Obrigada pelo carinho e zelo em impulsionar e me incentivar constantemente neste projeto, não só no trabalho árduo em laboratório, como também na apresentação de pôster e na divulgação científica. Te admiro demais e serei eternamente grata, por todo seu esforço, dedicação, ensinamentos, conselhos, confiança, conversas antológicas que me proporcionaram longas risadas e da nossa amizade que levarei para vida. Desse modo, agradeço também ao meu orientador Dr Ricardo Coutinho, pelo aceite de minha orientação, no qual proporcionou a minha entrada ao renomado Instituto (IEAPM). Gratidão pelo privilégio concebido, dos seus conselhos e orientações oportunas de sua vasta experiência acadêmica. Agradeço também a Tenente Dr^a Caroline Guerra pelas ideias iniciais desse projeto, saída em campo e pela sua articulação fundamental na parceria ao Instituto Federal Fluminense- IFF Campus Cabo Frio- Rj, onde pude conhecer pessoas incríveis como o diretor Dr Victor Saraiva e o Prof. Dr Ocimar Ferreira, que me ensinaram com aulas enriquecedoras e concederam o espaço no Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental (LEMAM-IFF), contribuindo assim na minha formação acadêmica. Ao discente e amigo Giovanna Redon, pela sua generosa contribuição, paciência e dedicação em laboratório. Sou grata pela disponibilidade que sempre mostraram para qualquer esclarecimento e pelo estímulo e apoio sempre manifestados. Agradeço também aos meus familiares Tio Paulo e Ana pela visitação ao manguezal na Praia de Juçatuba- MA. Aos buzianos Ivana e seu pai Ivair, pela contribuição neste trabalho no vasto conhecimento histórico regional do Mangue de Pedra. E, por fim, minha mãe Maria de Lourdes, que é meu alicerce e me impulsiona ao crescimento sempre.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 MANGUEZAIS: SERVIÇOS AMBIENTAIS E VULNERABILIDADE.....	1
1.2 MANGUEZAIS DE PEDRA NO MUNDO E NO BRASIL	5
1.4 FUNÇÕES ECOLÓGICAS MICROBIANAS EM MANGUEZAIS E POTENCIAIS BIOTECNOLÓGICOS.....	13
1.4.1. FITORREMEDIAÇÃO E RIZORREMEDIAÇÃO.....	15
1.4.2. FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMAs).....	19
1.4.3. BACTÉRIAS	22
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	25
3. HIPÓTESE.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 ÁREA DE ESTUDO	26
4.2. AMOSTRAGEM	28
4.2.1. COLETA DE ÁGUA	29
4.2.2. COLETA DE SEDIMENTO RIZOSFÉRICO E RAIZ.....	30
4.3. DESENHO EXPERIMENTAL	31
4.5. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	31
4.6. ANÁLISES DOS FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMAs)	32
4.6.1. MORFOTAXONOMIA DOS ESPOROS DE FMAs.....	32
4.6.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS FMAs	33
4.6.2.1. EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS E PCR	33
4.6.2.2. PURIFICAÇÃO, AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E QUANTIFICAÇÃO DO DNA E SEQUENCIAMENTO 18S	34
4.7. ANÁLISES DAS BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS	35
4.7.1. CULTIVO E ISOLAMENTO DAS CEPAS	35
4.8.1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS	37
4.8.1.1. EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS E PCR	37
5. RESULTADOS	39

5.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	39
5.2. FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES	40
5.2.1. MORFOTAXONOMIA DOS ESPOROS	40
5.2.2. IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA MOLECULAR de FMA	44
5.2. BACTÉRIAS	46
5.2.1. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS ISOLADAS	46
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO	58
8. PERSPECTIVAS	59
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
10. ANEXO	76
10.1 LICENÇA AMBIENTAL	76
10.2 ARTIGO SUBMETIDO	78

RESUMO

Os manguezais são ecossistemas costeiros presentes em regiões tropicais e subtropicais. Por serem altamente produtivos, tornam-se fundamentais para a biodiversidade. São associados à desembocadura de cursos d'água como rios, delta estuarinos e ao mar, sujeito a variação de maré. Os solos de manguezais são únicos, com características físico-químicas distintas, rica biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. A região que circunda às raízes das plantas, rizosfera, é um ambiente dinâmico com interações complexas entre microrganismos e plantas, promovendo reciclagem de nutrientes, fixação de carbono e resistência a estresses ambientais. A cidade de Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, abriga um raro manguezal com destaque a nível mundial, conhecido como Mangue de Pedra, que se desenvolve em solo rochoso e ausente de rio. O abastecimento de água doce é viabilizado pelo afloramento de água pluvial de um aquífero subterrâneo que se mescla à água marinha ao longo de uma estreita faixa de areia e blocos de rocha na Praia da Gorda. Nesse cenário raro e pouco estudado, é indispensável a compreensão da diversidade microbiana e potencial biotecnológico de bactérias e fungos micorrízicos arbusculares associados à rizosfera. A identificação desses microrganismos tem desafios devido à variedade morfológica e variação intraespecífica. Ferramentas moleculares são essenciais para entender essa diversidade e seu potencial biotecnológico. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade microbiana de FMAs e bactérias no sedimento rizosférico e raiz de vegetais no Mangue de Pedra, Búzios, Rio de Janeiro, Brasil visando o potencial desses microrganismos em uso biotecnológico. Amostras de água em quatro pontos do manguezal foram realizadas destinadas para análise de nutrientes (nitrito, nitrato, fosfato e amônio) e amostras de rizosferas e raízes para análises microbiológicas morfológicas e moleculares. Os ácidos nucleicos dos FMAs foram extraídos usando o Kit *DNeasy PowerSoil Pro*, a região gênica rRNA 18S foi analisada pela PCR dos genes universal de fungos e do filo *Glomeromycota*: NS1/NS4 e AML1/AML2, respectivamente, e encaminhadas ao sequenciamento Sanger. Adicionalmente, esporos de FMAs encontrados na rizosfera foram identificados morfo-taxonomicamente no microscópio. Para a análise bacteriana foi realizado, inicialmente, o cultivo e isolamento das colônias puras em Caldo Triptona Soja. Seguido das análises moleculares de extração de DNA usando o Kit *Wizard™ SV Genomic DNA*

Purification System e realizada a PCR e sequenciamento Sanger da região gênica rRNA 16S. Foram identificados onze gêneros bacterianos pertencentes aos filos *Actinomycetoma*, *Deferribacteriota*, *Bacillota*, *Pseudomonadota* e *Proteobacteria* e cinco espécies de FMAs (*Paraglomus occultum*, *Acaulospora spinosa*, *Funneliformis mosseae*, *Scutellospora calospora* e *Acaulospora cavernata*), incluindo espécies com potencial biotecnológico para biorremediação de hidrocarbonetos e metais pesados. A ausência de FMAs na raiz do único e recente espécime jovem de *Rhizophora mangle* neste manguezal sugere uma possível não colonização micorrízica. Esta pesquisa microbiológica pioneira nesta região, destaca a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre microrganismos com potencial biotecnológico e a diversidade microbiana em outros manguezais com sedimentos semelhantes.

Palavras-chave: Mangue de Pedra; Rizosfera; Microbioma; Caracterização Molecular; Bactérias; Fungos micorrízicos arbuscular; Potencial biotecnológico.

ABSTRACT

The mangroves are coastal ecosystems found in tropical and subtropical regions. Due to their high productivity, they are crucial for biodiversity. They are associated with the mouths of watercourses such as rivers, estuarine deltas, and the sea, subject to tidal fluctuations. Mangrove soils are unique, with distinct physicochemical characteristics, rich microbial biodiversity, and biotechnological potential. The region surrounding plant roots, the rhizosphere, is a dynamic environment with complex interactions between microorganisms and plants, promoting nutrient recycling, carbon fixation, and resistance to environmental stresses. In the city of Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, there is a rare mangrove of global significance known as Mangue de Pedra, which develops on rocky soil without a river. Freshwater supply is provided by the emergence of rainwater from an underground aquifer that mixes with seawater along a narrow strip of sand and rock at Beach of the Gorda. In this rare and understudied scenario, understanding the microbial diversity and biotechnological potential of bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) associated with the rhizosphere is essential. Identifying these microorganisms is challenging due to morphological variety and intra-specific variation. Molecular tools are essential for understanding this diversity and its biotechnological potential. Therefore, the objective of this study was to evaluate the microbial diversity of AMF and bacteria in the rhizospheric sediment and plant roots in Mangue de Pedra, Búzios, Rio de Janeiro, Brazil, aiming to explore the biotechnological potential of these microorganisms. Water samples from four points in the mangrove were collected for nutrient analysis (nitrite, nitrate, phosphate, and ammonium), and rhizosphere and root samples were collected for morphological and molecular microbiological analyses. For AMF, nucleic acids were extracted using the *DNeasy PowerSoil Pro Kit*, and the 18S rRNA gene region was analyzed by PCR using universal fungal genes (NS1/NS4) and Glomeromycota-specific genes (AML1/AML2), followed by Sanger sequencing. Additionally, AMF spores found in the rhizosphere were morpho-taxonomically identified under a microscope. For bacterial analysis, pure colony isolation was initially performed in Tryptone Soy Broth, followed by DNA extraction using the Wizard™ SV Genomic DNA Purification System. PCR and Sanger sequencing of the 16S rRNA gene region were then conducted. Eleven bacterial genera were identified, belonging to the phyla Actinomycetoma, Deferribacteriota, Bacillota, Pseudomonadota, and Proteobacteria. Five AMF species

were also identified, including species with biotechnological potential for hydrocarbon and heavy metal bioremediation (*Paraglomus occultum*, *Acaulospora spinosa*, *Funneliformis mosseae*, *Scutellospora calospora*, and *Acaulospora cavernata*). The absence of AMF in the roots of the only recent young specimen of *Rhizophora mangle* in this mangrove suggests a possible lack of mycorrhizal colonization. This pioneering microbiological research in the region highlights the need for further investigation into microorganisms with biotechnological potential and microbial diversity in other mangroves with similar sediments.

Keywords: Stone Mangrove; Rhizosphere; Microbiome; Molecular Characterization; Bacteria; Arbuscular Mycorrhizal Fungi; Biotechnological Potential.

1. INTRODUÇÃO

1.1 MANGUEZAIS: SERVIÇOS AMBIENTAIS E VULNERABILIDADE

Os manguezais são ecossistemas costeiros geradores de bens e serviços, com grande relevância ecológica, social e econômica (LEE *et al.*, 2020). As florestas de mangue, principalmente as mais jovens, desempenham um papel crucial na luta contra o aquecimento global por sequestrar e armazenar cerca de 3 a 5 vezes mais carbono do que florestas temperadas ou tropicais, favorecendo sua notoriedade mundial para a mitigação das mudanças climáticas com a iniciativa do Carbono Azul (SAFWAN AZMAN *et al.*, 2023). Além disso, os manguezais também contribuem com a redução da vulnerabilidade da zona costeira ao promoverem a retenção de sedimentos oriundos dos processos erosivos da elevação do nível do mar (ALONGI, 2008; KIRWAN; MEGONIGAL, 2013; LOVELOCK *et al.*, 2015).

Figura 1- Serviços ecossistêmicos dos manguezais e biodiversidade.



Fonte: Adaptado de LAI *et al.* (2022).

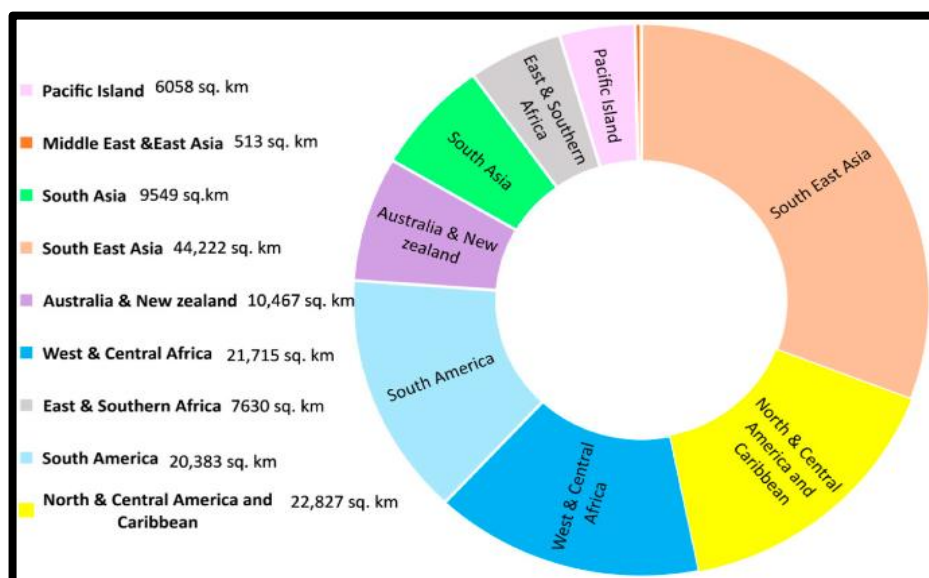
As florestas de mangue geralmente ocorrem em regiões costeiras abrigadas como estuários, baías e lagunas, propiciando condições favoráveis a alimentação, proteção e reprodução de muitas espécies de animais (AKRAM *et al.*, 2023). Além de promover a diversidade de flora e fauna, esses ecossistemas oferecem bens essenciais, tais como alimentos em termos de aquicultura e agricultura, lenha,

materiais de construção, medicamentos tradicionais e turismo local (Figura 1) (AKRAM *et al.*, 2023; LAI *et al.*, 2022).

A composição das espécies de manguezais está sujeita a mudanças geocronológicas e a distribuição da cobertura ao redor do mundo é desigual, não podendo ser explicada por um único fator de influência (LAI *et al.*, 2022). Os solos são formados por sedimentos de características variáveis devido as diferenças de origens, podendo ser originados no próprio ambiente a partir dos produtos de decomposição de rochas de diferentes naturezas, associados a materiais vulcânicos, graníticos, gnáissicos ou sedimentares, além da própria cobertura vegetal que pode modificar as características do substrato pela retenção da matéria orgânica (SCHAEFFER-NOVELLI; VALE; CINTRÓN, 2015).

A distribuição dos manguezais no mundo ocorre apenas na zona intertropical, com incursões ao norte do trópico de Câncer e ao sul do trópico de Capricórnio (OSBORNE, 2012). Atualmente estão distribuídos em 118 países, ocupando uma área total de 147.000 km² na distribuição global, onde a região do Sudeste Asiático possui a maior concentração de manguezais (OCHIAI *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2023) (Figura 2). Quinze países concentram aproximadamente 75% da população global de manguezais, no entanto, a maioria desses manguezais estão vulneráveis, pois apenas 6,9% estão em áreas protegidas (XIMENES *et al.*, 2023).

Figura 2- Distribuição global das florestas de mangue em uma área total no mundo.



Fonte: Adaptado de Akram *et al.* (2023).

No Brasil, atualmente existem 120 Unidades de Conservação (UC) que englobam manguezais brasileiros de diferentes níveis administrativos (55 federais, 46 estaduais e 19 municipais), sendo 83% de uso sustentável e 17% de proteção integral (ICMBIO, 2018). Apesar das diferentes tipologias como parques, áreas de proteção ambiental, reservas ecológicas, entre outras, os manguezais estão habilitados à inserção ou não em unidades de proteção integral e sustentável (OBRACZKA, 2018). Aproximadamente 578 mil hectares (ha) dos manguezais brasileiros são incluídos preponderantemente em Áreas de Proteção Ambiental (APA), enquanto que as Reservas Extrativistas integram 226 mil ha (ICMBIO, 2018).

A zona costeira brasileira perfaz 7408 km de contato com as águas do Oceano Atlântico, sendo o segundo país com a maior extensão de manguezais no mundo (aproximadamente 14000 km²) possuindo também o único manguezal oceânico do Atlântico Sul, em Fernando de Noronha (ICMBIO, 2018). As florestas de mangues se distribuem ao longo do litoral brasileiro desde o Estado de Amapá no município de Oiapoque (latitude de 04° 20' N) até o Estado de Santa Catarina no município de Laguna (latitude de 28° 30' S), com diferentes padrões de desenvolvimento estrutural da diversidade exibidos pelas florestas de mangue (ICMBIO, 2018).

Os manguezais brasileiros apresentam seis espécies típicas de bosques/florestas mangue: o mangue vermelho ou “sapateiro” gênero *Rhizophora*, (com as espécies *R. mangle*, *R. harrisonii* e *R. racemosa*); o mangue-branco ou “tinteira” (*Laguncularia racemosa*, gênero com uma única espécie), e o mangue-preto, siriba ou sereiba (gênero *Avicennia*, com as espécies *A. schaueriana* e *A. germinans*) (SCHAEFFER-NOVELLI; VALE; CINTRÓN, 2015). A distribuição da zonação das espécies em manguezais, descreve que espécies como *Rhizophora* suportam canais em sedimento com salinidade até 65%, e *Avicennia* e *Laguncularia* dominam em sedimento entre 65% a 100% da relação do gradiente salino (COELHO JÚNIOR, 1998).

Algumas espécies de mangue possuem “raízes-escora” – rizóforos características da espécie de mangue vermelho, outras possuem pneumatóforos características da espécie de mangue preto e branco que crescem em sentido oposto ao da força da gravidade - geotropismo negativo (SRIKANTH; LUM; CHEN, 2016). Essas raízes são providas de pequenas lenticelas (pneumatódios) que funcionam na oxigenação em substratos anaeróbicos e pela entrada de ar atmosférico (LU *et al.*, 2018; LU; IMLAY, 2021).

As plantas típicas de manguezal apresentam adaptações nas raízes para as trocas gasosas entre planta e ambiente durante a flutuação das marés (HUNTLEY, 2023). A gramínea *Spartina sp.*, muito comum em manguezais, apresenta adaptação ao meio ambiente inundado e com pouca oxigenação, sendo portadoras de cavidades próprias para armazenar ar nas partes aéreas da planta e tais estruturas auxiliam adicionalmente, a flutuação (KOOB-JAKOBSEN; FISCHER; WENZHÖFER, 2017).

A diversidade das raízes em manguezais revela suas adaptações ecológicas desempenhando um papel crucial na sobrevivência, como também nos ecossistemas circundantes (SUNKUR *et al.*, 2023). Em ecossistemas de manguezais, a interação entre as águas doces terrestres e as águas marinhas das marés geram um ambiente salobro físico-químico único, proporcionando uma zona de sedimentos exclusiva que abriga uma diversidade significativa de microrganismos com funções e metabolismo distintos (LAI *et al.*, 2022). A adaptação e sucessão dos manguezais estão possivelmente ligadas à diversidade microbiana nos sedimentos e nas raízes (LUNDBERG *et al.*, 2012; MAI *et al.*, 2021). Os microrganismos associados à raiz das plantas de mangue contribuem para o crescimento e estabelecimento desses vegetais, no entanto, a diversidade das comunidades microbianas, ao longo de um nicho contínuo permanece elusiva (SEHOANE *et al.*, 2023; ZHUANG *et al.*, 2020). Uma vez que certos padrões de exsudatos de raízes, assim como diferentes microambientes de rizosfera e substratos de manguezais, podem influenciar profundamente na diversidade das populações microbianas (ZHUANG *et al.*, 2020).

A distribuição de microrganismos no sedimento pode variar dependendo da amplitude das marés, inclinação topográfica, salinidade da água, pH, bem como o tipo de solo e suas propriedades físico-químicas (BOURGEOIS *et al.*, 2019). A retenção de sedimentos carregados pelos rios e as vegetações de mangue funcionam como um filtro biológico propiciando um nicho de microrganismos e matéria orgânica (NGUYEN *et al.*, 2016). Assim, há uma necessidade e muito potencial de pesquisa na área de microbiologia de manguezais com referência à ecologia, biogeoquímica e geomorfologia para fins biotecnológicos (LAI *et al.*, 2022).

Apesar de serem reconhecidos amplamente como importantes ecossistemas marinhos, potenciais biotecnológicos e de múltiplos serviços ecossistêmicos, a destruição das florestas de mangue continua a ser uma preocupação global, tornando-os um dos ecossistemas mais ameaçados e vulneráveis em todo o mundo (WAHYUNI *et al.*, 2021). Taxas alarmantes apontam o desaparecimento funcional dentro de 100

anos, e embora não possamos perder todas as árvores de mangue, os manguezais tenderão a serem reduzidos ao ponto da perda de seu propósito ecológico (CARUGATI *et al.*, 2018; POLIDORO *et al.*, 2010).

No Brasil, cerca de 25% dos manguezais foram destruídos desde o começo do século XX (ICMBIO, 2018). As principais ameaças dos manguezais no mundo estão relacionadas à especulação imobiliária, agricultura marítima, poluição e a rápida expansão de atividade petrolíferas como a exploração e produção de petróleo e gás natural (CARVALHO, 2011). O impacto por poluentes em florestas de mangue também tem sido uma grande preocupação na fauna e flora em áreas afetadas, principalmente pelas alterações ocasionadas por derivados de hidrocarbonetos (ROBIN; MARCHAND, 2022; MAGALHÃES *et al.*, 2022; THACHARODI *et al.* 2023).

Embora a poluição petrolífera ameace os manguezais, seu risco é considerado baixo em comparação com os impactos significativos causados pelo desenvolvimento costeiro, pela expansão da aquicultura e da agricultura, e pela extração de madeira (AKRAM *et al.*, 2023; PRAKASH *et al.*, 2021). Além das atividades humanas, as mudanças climáticas também aceleram a perda de manguezais por meio da erosão do solo, inundações e tempestades (HANLEY; BOUMA; MOSSMAN, 2020; SAFE'I *et al.*, 2022).

1.2 MANGUEZAIS DE PEDRA NO MUNDO E NO BRASIL

O substrato no qual ocorre a fixação dos manguezais é uma das principais características de formação desses ecossistemas, sendo classificados em quatro tipos: pantanoso, turfoso, rochoso e arenoso (RITCHIE, 2005). Os dois primeiros possibilitam a existência de bosques bem desenvolvidos, enquanto em substratos areno-rochoso as árvores costumam ser de baixa estatura e bosques subdesenvolvidos, distribuindo-se sobre rocha vulcânica sólida, pedras e recifes de corais (FRANÇA *et al.*, 2020; OHNO *et al.*, 2022).

Manguezais que crescem em sedimento rochoso são poucos descritos no mundo. Devido à escassez de estudos pouco se conhece sobre sua dinâmica ecológica, interações biológicas e associações das comunidades microbianas (GÓMEZ-ACATA *et al.*, 2023).

No município de Armação dos Búzios, estado do Rio de Janeiro, Brasil existe um manguezal que prosperou sobre um substrato rochoso (areia grossa, grânulos,

seixos blocos e pedregulhos) onde a água doce é alimentada por um sistema de água subterrânea, daí a designação Mangue de Pedra ou 'Stone Mangrove' (MANSUR, 2010; OBRACZKA, 2018).

Apesar de raros globalmente, outros exemplares de manguezais sobre pedra são encontrados (Figura 3). As Ilhas Galápagos, dispõe de manguezais que crescem diretamente sobre campos de lava sólidos, em um ambiente inóspito, com uma topografia costeira abrupta que estreita a zona entre marés. Exposto às atividades de ondas e com ausência de rios e estuários permanentes, nesses manguezais podem ser encontradas as plantas de mangue: *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans* e *Laguncularia racemosa*, porém subdesenvolvidos (MOITY *et al*, 2019).

Figura 3- A) Manguezal em Galápagos, Foto: Hans Johnson (CC BY 2.0). B) Árvores de mangue situado na Ilha Shaheed, Andaman, Índia. Foto: Vyacheslav Argenberg. C) Mangues sobre pedra, Clairview, Queensland, Austrália. Foto: Paul Asman e Jill Lenoble (CC BY 2.0).



Fonte: Eos Consultants, pt *Speed & Service*.

Nas Ilhas de Andaman e Nicobar, Índia, apresenta uma vegetação que se estende por diversas áreas costeiras, incluindo vastas florestas de mangue que se distribuem sobre rochas ígneas - abrangendo 15% da região e por formações coralinas e calcárias (BANDOPADHYAY *et al*, 2017). A água doce subterrânea é predominantemente encontrada em aquíferos de rochas ígneas fraturadas, onde a densidade de fraturas favorece uma maior disponibilidade de água subterrânea, como em Rutland Island, Panchavati Hills (Médio Andaman) e Saddle Peak, ao Norte Andaman. (BANDOPADHYAY *et al*, 2017). Em Queensland, Austrália, são encontrados outros exemplares de manguezais sobre pedra.

(BOMFIM, 2019) citam outros exemplares de manguezais de pedra no Japão e no Recife (Brasil). Ainda no Brasil, no município de São José do Ribamar, estado do Maranhão um manguezal de características do tipo franja, se desenvolve em uma praia arenosa na presença de pedras e blocos de rocha, e substrato aluvial (lamoso), conhecida localmente como praia do Unicamping-Juçatuba (Figura 4). Neste local, é

possível observar plântulas e árvores de mangue branco *Laguncularia racemosa*, *Rhizophora sp.* e *Avicennia sp.* se desenvolvendo entre rochas e pedregulhos.

Além das praias Unicamping, Juçatuba, dos Prazeres e Ariubal, banhadas pelas águas da Baía de São José, sua formação é composta por sedimentos arenosos e argilosos cobertos por cascalho laterítico, oriundo de processos erosivos abrasivos das falésias, compondo um ambiente com alto potencial turístico (BANDEIRA, 2020). O município de São José de Ribamar abriga três importantes bacias hidrográficas, a do rio Tibiri, rio Guarapiranga e rio Geniparana (RABELO, 2020).

Figura 4. Plantas de mangue sobre solo rochoso localizado na Praia de Juçatuba, São José do Ribamar-MA.



Fonte: Autora (junho/2023).

1.3 MANGUEZAIS DE PEDRA EM ARMAÇÃO DE BÚZIOS, RJ

O município de Armação dos Búzios, RJ, dispõe de três manguezais sobre pedra (Figura 5) situados na: Ponta da Sapata, Manguinhos; Praia da Foca; e na Praia da Gorda-Rasa, ocupando uma área total de 0,014 km² e de bacia contribuinte de 0,180 km² (BOMFIM, 2019).

Conforme o Decreto 1059/2018 criou-se a Área de Proteção Ambiental (APA) Mangue de Pedra onde engloba uma área de 75 hectares (ha) constituída pela Falha Pai Vitório e a Praia da Gorda (CAMARA MUNICIPAL DE ARMAÇÃO DOS BÚZIOS, 2018). Este manguezal está situado na parte do território americano que se manteve colado ao continente africano após o rifteamento mesozóico, evento que recebeu a denominação de Orogenia Búzios (SCHMITT, 2001).

Figura 5- Mapa das localizações geográficas dos manguezais sobre pedra em Armação de Búzios, Rio de Janeiro.



Fonte: Google Earth.

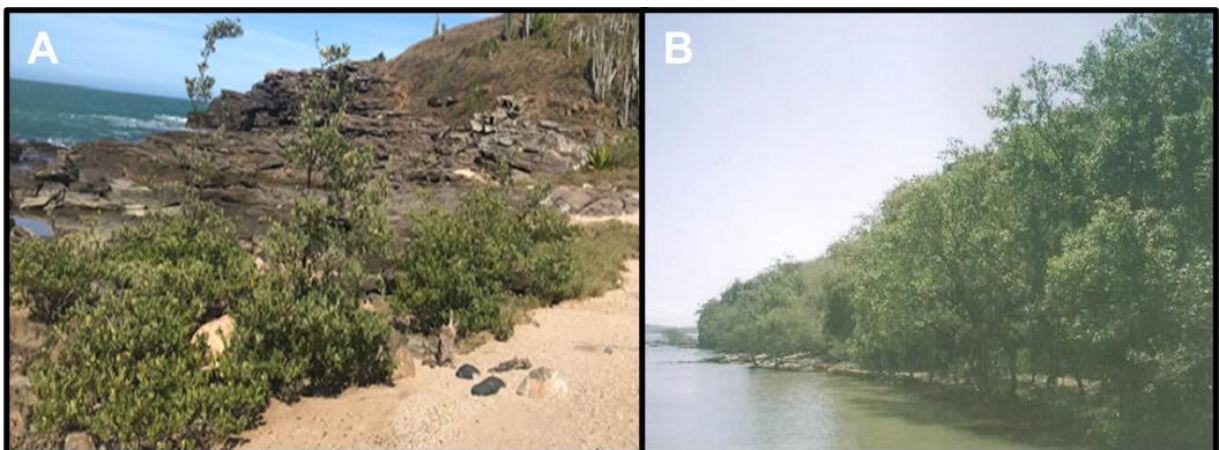
Os manguezais sobre pedra do município de Armação dos Búzios, são caracterizados por substrato areno-rochoso pela presença de água salobra sem aporte fluviais, viabilizados pelo afloramento de água doce subterrânea proveniente de aquíferos de águas pluviais (ALBUQUERQUE et al., 2022; MANSUR, 2010).

Na Praia da Foca (Figura 6A) é observado um pequeno manguezal de aproximadamente 100m². Devido à alta energia oceânica dificilmente um manguezal

de borda poderia se desenvolver na Praia da Foca, porém a concavidade da praia e barreira de pedras, e a presença de aquífero granular, formado por material arenoso, marinho ou de paleodunas, permitiu o estabelecimento de propágulos de mangue-preto *Avicennia schaueriana*, sendo considerado um manguezal monoespecífico (MANSUR, 2010; SOFFIATI, 2011).

Na extremidade da Praia de Manguinhos, conhecido como Ponta da Sapata (Figura 6B) exibe um manguezal de características do tipo franja, apresentando árvores de mangue branco e mangue-preto bem enraizadas e de grande porte (SOFFIATI, 2011). O local é bastante protegido da energia oceânica, com rochas formadas no fundo do oceano que existiu antes do Atlântico e pela formação de Barreiras (MANSUR, 2010; SOFFIATI, 2011).

Figura 6- A) Manguezais sobre pedras, Praia da Foca. B) Manguezal Ponta da Sapata, Praia de Manguinhos.



Fonte: Imagem (A), Autora (julho/2022). Imagem (B), Rota Verde, Blog Ambiental. Data de acesso: (12/09/2023).

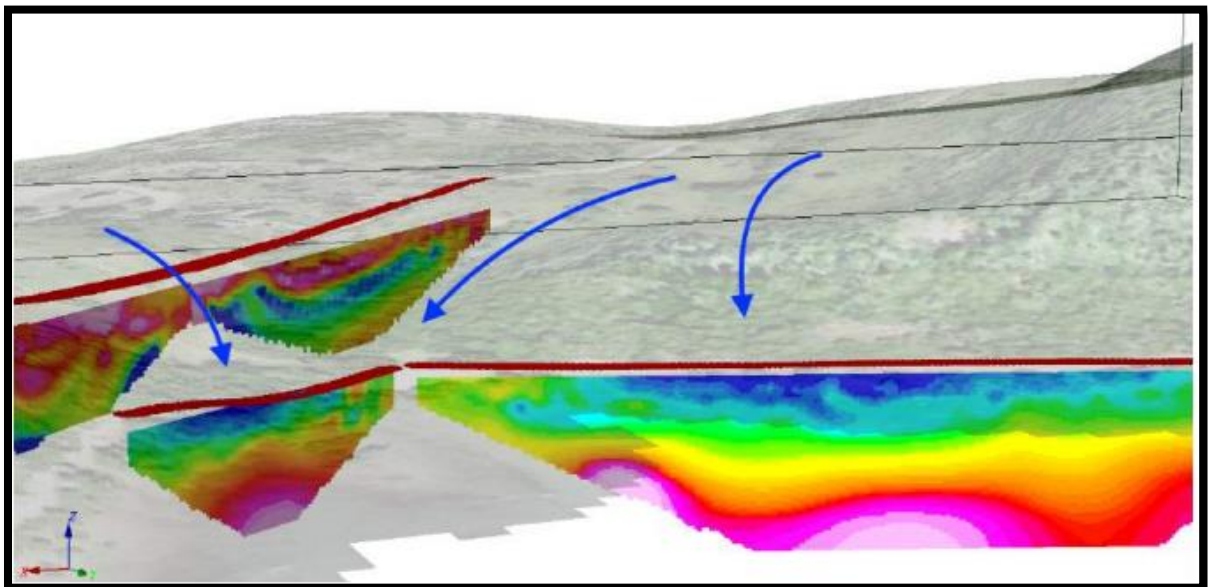
O Mangue de Pedra, localizado na Praia da Gorda, área deste estudo, (Figura 8), está inserido em um cenário litológico de um importante sistema de falhas geológicas dentro de um arcabouço tectônico, o Graben de São João da Barra (MOHRIAK *et al.*, 1990). Esse Graben favoreceu a formação da Falha geológica Pai Vitório responsável em colocar em contato as rochas ortognaisses e ortoanfibolitos paleoproterozóicos de cerca de 2 bilhões de anos, com os sedimentos conglomeráticos de origem fluvial da Formação Barreiras cuja idade é atribuída ao Mioceno de cerca de 20 a 2 milhões de anos (DIAS *et al.*, 2019; SCHMITT, 2001). A Falha geológica Pai Vitório (Figura 9), oferece armadilhas e barreiras para compor o aquífero Mangue de Pedra e a presença de um canal menos salino (ALBUQUERQUE *et al.*, 2022). A escarpa da Falha Pai Vitório condicionou a deposição em leque

aluvionar de sedimentos compostos por intercalações de cascalhos, areias e argilas que resultou na formação do aquífero Mangue de Pedra (CICCO, 2018).

Estudos recentes revelaram que o nível da água do aquífero varia de 25m acima do nível do mar (ALBUQUERQUE *et al.*, 2022). Estas falhas forneceram requisitos para a existência do manguezal como a canalização das águas menos salinas e água doce pela formação de aquífero, e blocos de brechas de calcedônia resistentes à erosão, protegendo o meio ambiente local do impacto das ondas do mar (ALBUQUERQUE *et al.*, 2022).

O Mangue de Pedra é estabelecido sobre substrato de conglomerado de arenito de Formação de Barreiras e viabilizado pela presença do Aquífero Mangue de Pedra (Figura 7), existente na encosta das paleofalésias e na base da praia (MANSUR, 2010). Há presença de muitas conchas misturadas nos sedimentos arenosos em toda faixa de areia. Este raro manguezal é sustentado pelo afloramento de água pluvial subterrânea que ocorre ao nível do mar alterando a salinidade da água localmente, propiciando a existência desse peculiar ecossistema (ALBUQUERQUE *et al.*, 2022; MANSUR, 2010).

Figura 7- Mapa da paleofalésia em 3D realizado pelo CICCO (2018) com os possíveis trajeto da água doce pluvial destacado em azul em direção ao Mangue de Pedra.



Fonte: Cicco, (2018)

A associação da geodiversidade local proporciona um ecossistema único de condições propícias para fauna e flora nesse manguezal (Figura 8).

Figura 8- Blocos de rochas na linha da costa em baixa maré e disposição da vegetação no Mangue de Pedra, Praia da Gorda, Armação dos Búzios, RJ.



Fonte: Autora (agosto/2023).

Figura 9. Falha geológica Pai Vitório, localizada no limite sul do Graben da Barra de São João e desempenha um papel importante na formação do substrato Mangue de Pedra onde os sedimentos da Formação Barreiras na área são interpretados como depósitos de leques aluviais condicionados pela escarpa da falha Pai Vitório (OBRACZKA *et al.* 2018).



Fonte: Autora (agosto/2023)

No entorno deste manguezal, as paleofalésias da Formação Barreiras na Praia da Gorda apresentam vegetação típica da região de clima semiárido, sendo sua preservação fundamental na proteção contra erosão e proteção do aquífero evitando a contaminação da água subterrânea (OBRACZKA, 2018).

A restinga de Búzios/Cabo Frio, a mais rica em espécies no Estado do RJ, abriga 26 das 32 espécies endêmicas das restingas do Rio de Janeiro (ARAÚJO, D.S.D.,1997). Conhecida como "savana estépica", a região possui muitos cactos de até 4 metros de altura e mata baixa de 3 metros nas áreas expostas ao spray marinho e aos ventos, com árvores de copas adensadas (ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2017).

Além da importância científica e alto valor cênico de relevância turística, o Mangue de Pedra da Praia da Gorda, também agrega valores culturais na presença de comunidades de pescadores, marisqueiras e quilombolas (MANSUR; GUEDES; ALVES, 2012). Apesar da relevante importância tanto do ponto de vista ecológico, científico, econômico e social, esse ecossistema é ameaçado pela especulação imobiliária. Em 2012, foi aprovado a construção do empreendimento Gran Riserva 95 com 221 casas geminadas em 5 vilas, o que infringe o Plano Diretor do município de Búzios, e afetaria de forma desastrosa e irreversível a manutenção da APA Mangue de Pedra, seja pela impermeabilização do solo para a construção ou pela poluição (OBRACZKA, 2018). Segundo (ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2017), a licença foi cassada pelo próprio município após ONGs locais denunciaram o empreendimento ao Ministério Público exigindo que no local fosse criada uma Unidade de Conservação de Proteção Integral.

Nesta área da Praia Gorda, o Mangue de Pedra e a Ponta do Pai Vitório (restinga, reserva de Pau-Brasil) são pontos considerados estratégicos para a conservação considerados pelo Plano Diretor do município como AEIA-4 (Arpoador da Rasa/Praia Gorda), tendo como diretriz a criação/implantação do Parque Municipal da Praia Gorda-Ponta do Pai Vitório e a regularização fundiária, urbanística e edilícia (ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2017).

Considerado o terceiro geossítio de maior importância científica do DTCF (Domínio Tectônico de Cabo Frio) o Mangue de Pedra, foi submetido à UNESCO como proposta de Geoparque internacional, sendo uma das mais relevantes do país em termos de geologia integrado ao projeto do Geoparque Costões e Lagunas do Estado do Rio de Janeiro (MANSUR, 2010).

A incidência de ações antrópicas significativas como o lançamento de efluentes domésticos não tratados, retirada de pequenas conchas inadequadamente e incidentes de derramamento de óleo no Mangue de Pedra tem aumentado ao longo dos anos. Em abril de 2019, pelotas de óleo cru atingiram o Mangue de Pedra, Praia da Gorda após um acidente na plataforma P-53 situada no campo de Marlim Leste, Rio de Janeiro (ANP/SSM; IBAMA, 2020). Outra ocorrência relevante ocorreu em janeiro de 2022, após o grande despejo de efluentes no Rio Una atingindo a Praia da Gorda (Figura 10), onde representantes da sociedade civil de Búzios realizaram um ato de repúdio ao incidente. Essas atividades impactam negativamente o ambiente, causando efeitos adversos na qualidade da água, na biodiversidade e na saúde do manguezal.

Figura 10. Manchas escuras na Praia Gorda, atingindo o Mangue de Pedra após o grande despejo de efluentes no Rio Una.



Fonte: Autora (24/01/2022).

1.4 FUNÇÕES ECOLÓGICAS MICROBIANAS EM MANGUEZAIS E POTENCIAIS BIOTECNOLÓGICOS

As comunidades microbianas dos manguezais são participantes ativos dos ciclos biogeoquímicos, como o ciclo do carbono e o ciclo do nitrogênio, fornecendo nutrientes para plantas e animais (LAI *et al.*, 2022). O ecossistema “Carbono Azul” como são conhecidos os manguezais, além da estocagem de carbono da atmosfera possui procariontes como bactérias e arqueias que regulam o fluxo de carbono por metanogênese removendo o carbono inorgânico (HILMI *et al.*, 2021).

Uma ampla diversidade de comunidades microbianas encontradas em raízes de mangue, como por exemplo, bactérias diazotróficas podem realizar a fixação biológica de nitrogênio e fornecer cerca de 40 a 60% do nitrogênio total utilizados pelos próprios manguezais (REEF; FELLER; LOVELOCK, 2010).

A escassez de nutrientes como nitrogênio e fósforo (P) nos sedimentos de manguezais, combinada com o processo de alagamento das marés próximo à rizosfera, induz os microrganismos a desempenharem funções especializadas, como a fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, assimilação fotossintética, redução de sulfato, síntese enzimática e degradação de hidrocarbonetos (LAI *et al.*, 2022).

Apesar da disponibilidade de fósforo (P) em manguezais ser limitada, a relação simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares FMAs e plantas por exemplo, podem incorporar minerais como (P) e água através das hifas de FMAs ao estender a zona de depleção (KOTHAMASI *et al.*, 2006; TRIVEDI *et al.*, 2020). Além disso, FMAs podem aumentar a disponibilidade de nutrientes pelo transporte de longa distância através do micélio e estruturas especializadas chamadas arbúsculos (hifas fúngicas envoltas em uma forma modificada da membrana plasmática da célula cortical) que transportam elementos diretamente para o citoplasma do hospedeiro (TRIVEDI *et al.*, 2020).

No solo de mangue a carência de oxigênio e a abundância de matéria orgânica o torna um microambiente ideal para bactérias redutoras de sulfato como a *Desulfobacterales* que aliviam a toxicidade de sulfetos em condições anaeróbias acelerando a transformação de carbono e nutrientes, facilitando a sobrevivência e sucessão de manguezais (MAI *et al.*, 2021). Este processo respiratório é considerado um dos mais importantes nos sedimentos de manguezais por gerar condições químicas que retardam a renovação da matéria orgânica nos sedimentos de mangue (QIAN *et al.*, 2023).

A composição microbiana nos sedimentos de mangue é influenciada por diversos fatores, como tamanho das partículas do solo, pH, condições redox, quantidade de matéria orgânica em decomposição, teor de carbono orgânico e nível de umidade (HELPER; HASSENRÜCK, 2021). Esses microrganismos são considerados potenciais bioindicadores de mudanças ambientais, com sua rápida taxa de crescimento e resposta delicada à biodisponibilidade de nutrientes e propriedades ambientais como pH, salinidade e temperatura (HARRISON; BOL; BARDGETT, 2007).

De fato, a comunidade microbiana e o microbioma de manguezais, incluindo bactérias, arqueias, fungos e protistas, são vitais na manutenção da produtividade primária, proporcionando transformações de nutrientes e auxiliando na conservação da vegetação de mangue (LAI *et al.*, 2022). Compreender a relação entre os

manguezais e a microbiota é crucial para a conservação e reabilitação eficazes desses ecossistemas, dado o vínculo significativo entre a saúde dos manguezais e as interações microbianas (LAI *et al.*, 2022).

1.4.1. FITORREMEDIAÇÃO E RIZORREMEDIAÇÃO

Uma vez que, microrganismos estão ativamente envolvidos na degradação de diversos contaminantes transformando-os em nutrientes, água e dióxido de carbono, tecnologias alternativas de descontaminação como a biorremediação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são consideradas como um método eficaz (REJINIEMON *et al.*, 2022).

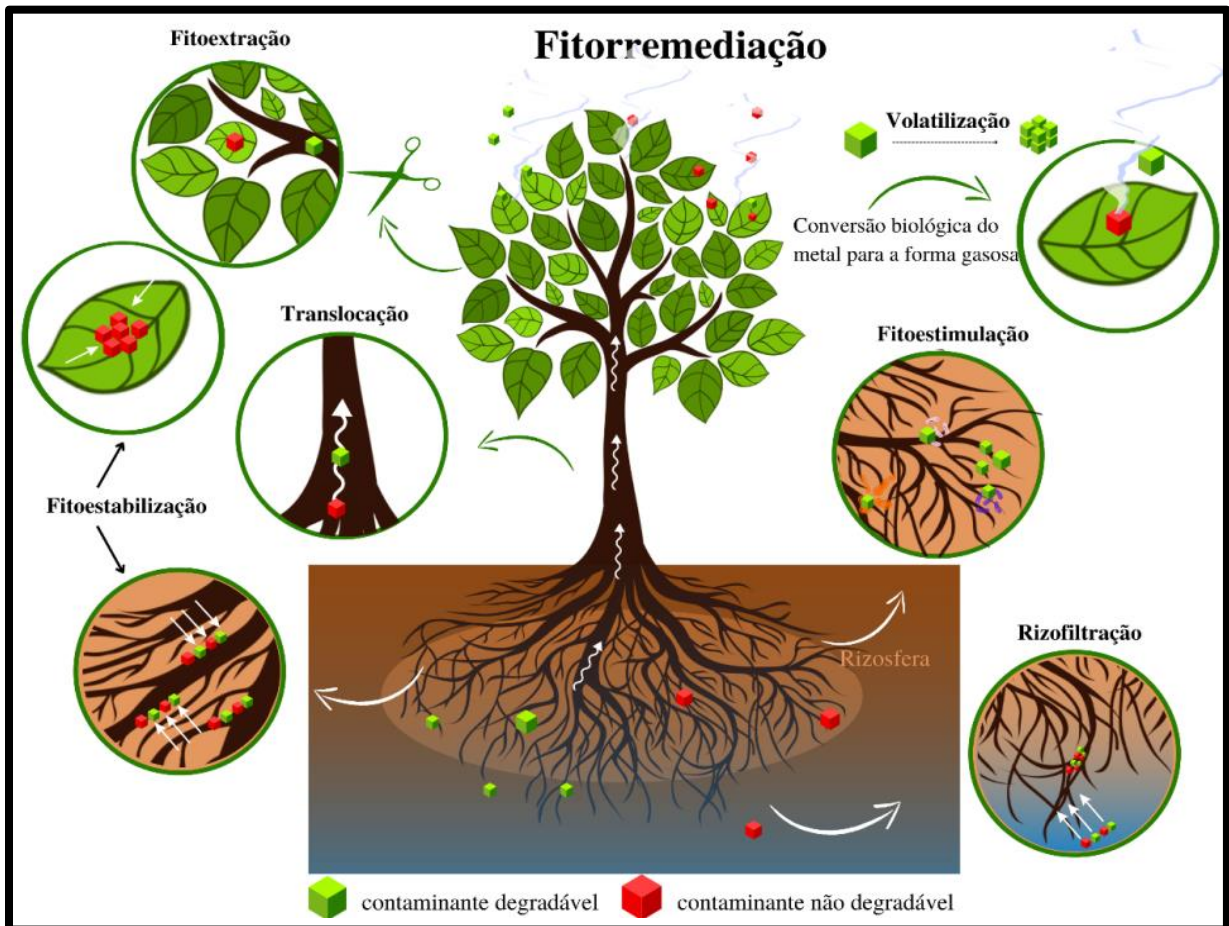
A fitorremediação se destaca com uma subárea da biorremediação, que envolve o uso de plantas e microrganismos associados às suas raízes a fim de reduzir o impacto ambiental (TRIVEDI *et al.*, 2020). Sendo uma alternativa promissora para recuperar solos poluídos e contribuir para a redução do dióxido de carbono (CO₂), uma vez que as plantas transformam CO₂ em glicose pela fotossíntese (AGHILI; GOLZARY, 2023).

As plantas de mangue apresentam diferentes mecanismos de fitorremediação à exposição de hidrocarbonetos (CHEQUER *et al.*, 2017; MACHADO; LACERDA, 2004). Essas diferenças podem estar atribuídas à fisiologia da planta e na resistência às substâncias específicas de cada grupo de óleos (GETTER; BALLOU; BRUCE KOONS, 1985). Os mangues pretos, por exemplo, são mais propensos a mortalidade nas altas concentrações de frações alifáticas, enquanto os mangues vermelhos nas altas concentrações de frações aromáticas (SAMPAIO *et al.*, 2021).

O sucesso da fitorremediação depende da capacidade de sobrevivência/tolerância das plantas aos contaminantes (CHEQUER *et al.*, 2017). Pesquisa com crescimento de propágulos de mangue submetidas a óleo tem demonstrado uma maior resistência de *R. mangle* comparado aos mangues *L. racemosa* e *A. Schaueriana* (MORADI *et al.*, 2021). Essa resistência possivelmente se deve à capacidade de *R. Mangle* de impedir a absorção de óleo por suas raízes (SAMPAIO *et al.*, 2021). Espécies de plantas do gênero *Rhizophora* são sal-excludentes e utilizam um sistema de filtros na superfície das suas raízes com capacidade de impedir a absorção de alguns metais (MACHADO; LACERDA, 2004).

Dentre os mecanismos de fitorremediação realizados pelas plantas de mangue para modificar e remover poluentes dos solos, vale destacar a fitoestabilização, fitoextração, fitoestabilização e rizofiltração (Figura 11).

Figura 11- Mecanismos específicos da Fitorremediação representado pela Fitoextração, Fitoestabilização, Translocação, Volatilização, Fitoestimulação e Rizofiltração



Fonte: Pereira, (2022).

Na fitodegradação, ocorre a degradação de poluentes orgânicos por meio de atividades enzimáticas pelo vegetal (KAFLE *et al.*, 2022). A transformação química dos poluentes que são incorporados à lignina da parede do vegetal é conhecida como fitoestabilização, no qual ocorre também a participação de bactérias simbiotes (YAN *et al.*, 2020). Na fitoextração, as plantas podem extrair e acumular em seus tecidos o poluente do solo na sua formação original. A biodegradação de poluentes orgânicos por microrganismos aderidos às raízes de plantas é conhecida como rizodegradação (SIVARAM *et al.*, 2020).

A rizorremediação, composta pelo uso combinado de raízes das plantas para remover contaminantes do solo ou da água, tem sido uma proposta alternativa para

reabilitação de solos multi contaminados (CHENG; ZHOU; YU, 2019) Esta técnica de remediação ambiental é utilizada devido ao seu potencial de desintoxicação por organismos vivos, convertendo inclusive resíduos orgânicos perigosos como xenobióticos em dióxido de carbono e água (ALI *et al.*, 2022).

A rizosfera é um microcosmo de inter-relações microbianas, onde cada espécie tem sua função e está envolvida direta ou indiretamente no desenvolvimento das plantas e no equilíbrio do sistema (MEDRI, 2002). Apresenta um nicho desejável (Figura 11) para a proliferação de comunidades microbianas e pode ter 1.000 a 2.000 vezes mais microrganismos do que o solo descoberto ou cultivado (MCNEAR JR., 2013). As populações de microrganismos rizosféricos são afetadas por exsudatos, lisatos, secreções e fragmentos de tecidos, todos provenientes da raiz (LU *et al.*, 2018). Os microbiomas das raízes dos manguezais apresentam padrões de diversidade e função influenciados pelos exsudatos radiculares que modificam a composição microbiana, especialmente na epísfera e rizosfera (LUO *et al.*, 2018; SAKHIA *et al.*, 2016).

O desenvolvimento da rizosfera é um processo dinâmico onde estão relacionados processos químicos, físicos e biológicos que modificam a interface raiz-solo (MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013). A distribuição da vida na rizosfera (Figura 12) demonstra uma abundância de vários grupos microbianos que incluem: fungo micorrízicos, bactérias endofíticas, vírus, bem como a dominância de r e k estrategistas (KUZYAKOV *et al.*, 2019).

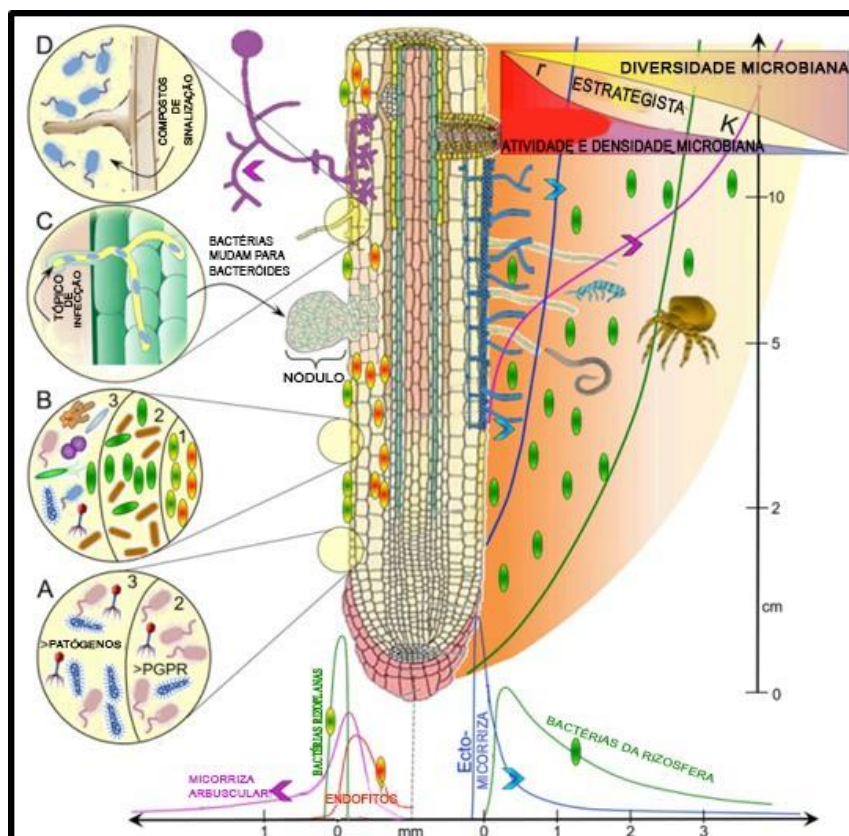
A introdução seletiva de microrganismos autóctones na rizosfera de uma planta com grande capacidade biodegradante, pode acelerar a recuperação de solos contaminados com produtos químicos inorgânicos e orgânicos (GONÇALVES, 2012).

Algumas espécies de bactérias, fungos, leveduras e algas possuem habilidades de degradar compostos derivados de HPAs e metais pesados, entretanto, nos últimos anos a capacidade de biodegradação de bactérias e fungos tem sido objeto de maior foco e investigação (THACHARODI *et al.*, 2023). Comunidades microbianas complexas formadas por rizobactérias e fungos micorrízicos cooperam com as plantas para diminuir a toxicidade de contaminantes por meio de rizodegradação ou fitoestabilização (MALICKA *et al.*, 2022). Estes microrganismos estabelecem simbiose com as raízes das plantas e podem contribuir para a retenção de metais nas raízes, mitigando assim os potenciais efeitos adversos do contaminante ao inibir sua translocação para a parte aérea do vegetal (CHRISTIE; LI; CHEN, 2004).

O uso de espécies microbianas nativas ou consórcios microbianos na biorremediação pode representar uma abordagem promissora e eficiente para a recuperação de ecossistemas de manguezais poluídos por metais pesados (como Al, Fe, Pb, Cr, Cu, Zn, Ni) e HPAs (NGUYEN *et al.*, 2016; SAMPAIO *et al.*, 2021; SEHOANE *et al.*, 2023). Estratégias de isolamento e bioaugmentação de microrganismos nativos do solo ou de plantas de mangues são comumente usadas como inoculantes para resolução de problemas ambientais nos esforços de revegetação e remediação em manguezais (L.E. de-BASHAN *et al.* 2012).

Apesar do uso de microrganismos autóctone para biodegradação de HPAs e revegetação, o conhecimento dos organismos potencialmente dotados de aplicabilidade biotecnológica no Mangue de Pedra é escasso.

Figura 12- Apresentação esquemática geral da rizosfera representando a abundância de grupos microbianos ao longo de gradientes de distância da raiz. Inclui micorrizas arbusculares, ectomicorrizas, vírus e rizobactérias. Os detalhes ampliados à esquerda representam a distribuição microbiana: A) maior densidade de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR) em rizosfera (2) comparados ao reverso do solo em massa (3) apresentando patógenos. B) abundância de vários grupos microbianos no rizoplane (1), na rizosfera (2), e no solo em massa (3). C) liberação de compostos de sinalização e atração de rizóbios e outros PGPR. D) Colonização de pelos radiculares por rizóbios e formação de nódulos. A apresentação esquemática da abundância dos grupos microbianos individuais à esquerda ou à direita da raiz é feita apenas para evitar sobreposições excessivas das curvas.



Fonte: KUZYAKOV *et al.* (2019).

1.4.2. FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMAs)

Com surgimento há mais de 450 milhões de anos, as endomicorrizas desenvolveram associações simbióticas com diversas espécies de plantas desde que começaram a crescer no ambiente terrestre (CAIRNEY, 2000; FERROL; LANFRANCO, 2020; SEHOANE *et al.*, 2023). Os FMAs, um dos tipos de endomicorrizas, pertencem ao filo monofilético *Glomeromycota* e são encontrados em diversos ecossistemas naturais sendo considerados organismos complexos (PARNISKE, 2008). Esses fungos, os quais colonizam 70-90% de espécies de plantas vasculares possuem a peculiaridade de serem biotróficos obrigatórios, pois dependem do tecido radicular vivo para o suprimento de carbono na forma de carboidratos ou lipídeos para completar seu ciclo de vida (SEHOANE *et al.*, 2023). Além disso, até 20% dos produtos da fotossíntese podem ser consumidos pelos FMAs e as plantas incorporam minerais como fósforo e água obtendo também maior tolerância a estresses bióticos, abióticos e durante a redução da concentração de nutrientes (TRIVEDI *et al.*, 2020).

A colonização das raízes pelos FMAs se dá por hifas que se originam de propágulos encontrados no solo na forma de esporos, micélio e fragmentos de raízes colonizadas. As micorrizas (do grego, *mykes*=fungo e *rhiza*=raiz), formadas pelas associações simbióticas entre fungos de solo e raízes de plantas, distinguem-se em dois grandes grupos: ectomicorrizas e endomicorrizas (SCHÜBLER; SCHWARZOTT; WALKER, 2001).

A associação de ectomicorrizas ocorre com a colonização das hifas entre as células no córtex da raiz, não ocorrendo estruturas intracelulares diferenciando-se assim das endomicorrizas cujo as hifas ocorrem inter e intracelularmente nas células do córtex da raiz (CHOT; REDDY, 2022). As endomicorrizas mais comuns são as dos tipos arbusculares, uma estrutura subcelular em forma de árvore presente entre a parede celular da raiz e a membrana plasmática. Outra estrutura que pode aparecer na simbiose são as vesículas, que são estruturas fúngicas que acumulam principalmente fosfato na forma de polifosfatos (BRUNDRETT; TEDERSOO, 2018). Esses corpos globosos ricos em lipídeos, não são encontrados em algumas espécies de endomicorrizas (HOFFMAM, LUCENA, 2006).

Além do desenvolvimento de uma rede micelial cenocítica, os FMAs possuem grandes esporos assexuados com múltiplos núcleos (LEE *et al.*, 2020). Cada núcleo, dentro de uma hifa ou esporo cenocítico, contém diferentes variantes de sequências polimórficas de DNA e hifas de diferentes isolados da mesma espécie podem trocar material genético (FERROL; LANFRANCO, 2020).

Raízes de plantas colonizadas por fungos micorrízicos comparadas com as não colonizadas podem obter um aumento da superfície de absorção das raízes em até 700% (MOREIRA, SIQUEIRA *et al.*, 2006). A aquisição de nutrientes pelos FMAs fornece minerais de baixa mobilidade no solo como P, Zn, Cu, através da grande rede de micélios extra radicais que desenvolvem (FERROL; TAMAYO; VARGAS, 2016). Além de melhorar a nutrição mineral das plantas, os FMAs podem aliviar a toxicidade dos metais pesados que são tóxicos quando presentes em excesso como Cu, Zn, Fe e Mn, sendo considerados um elemento-chave na fitorremediação de solos poluídos (FERROL; LANFRANCO, 2020).

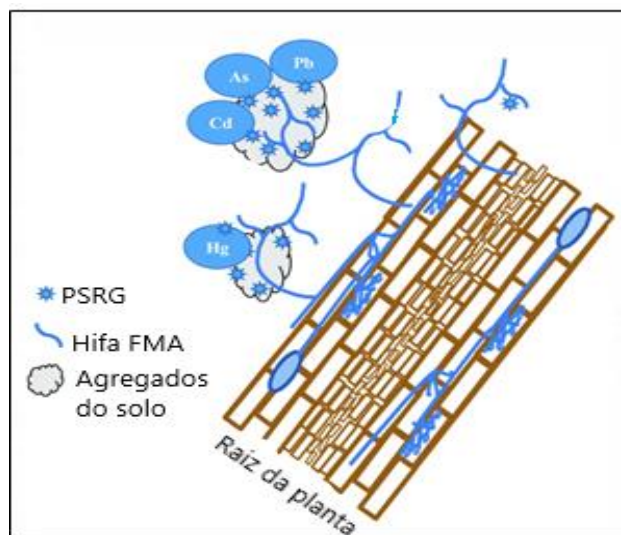
Segundo VERGARA *et al.* (2019) a maior parte dos metais absorvidos pelo FMA pode ser usada para seu funcionamento, enquanto o metal excedente é transferido para a planta. A via micorrízica envolve transportadores metálicos de alta afinidade localizados no micélio extraradical, seguido pela translocação do metal ao longo das hifas para estruturas intracelulares.

Genes que codificam proteínas de transporte de absorção de Cu, Zn, Fe foram identificados através do sequenciamento do genoma e análises transcriptômicas de *R. irregularis* (TAMAYO *et al.*, 2014; TISSERANT *et al.*, 2013). Genes transcricionais de FMA como transportadores de Cu (RiCTR1 e RiCTR3); permease de zinco-ferro (ZIP) ou proteína semelhante (ZRT-IRT); e a permease de ferro (RiFTR1) participam do efluxo na redução desses metais frente a exposição (DHALARIA *et al.*, 2020; FERROL; TAMAYO; VARGAS, 2016).

Metais pesados também podem ser estabilizados através da quelação de íons metálicos pela glicoproteína glomalina, compartimentalizados nos vacúolos como polifosfatos, sendo translocados para os esporos (WANG *et al.*, 2019). A Proteína do Solo Relacionada à Glomalina (PSRG) é produzida abundantemente em hifas e pelos esporos dos FMAs, associadas a uma longa lista de benefícios para a saúde das plantas e do solo, incluindo agregação de solo e água, sumidouro de longo prazo para armazenamento de carbono e nitrogênio e aumento do crescimento dos vegetais sob estresse abiótico (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2014; QIU *et al.*, 2022). Além disso, a

PSRG tem a capacidade de sequestrar metais como Pb, Cd, Zn e Mn, (Figura 13) reduzindo a toxicidade metálica em plantas (PRAUSE; SCHULZ; WAGLER, 1984; ZULFIQAR *et al.*, 2023).

Figura 13- Complexação de metais pesados pela proteína do solo relacionada à glomalina (PSRG) ao longo das hifas de FMAs.



Fonte: Adaptado de KRISHNAMOORTHY *et al.* (2019)

Os FMAs são organismos ubíquos, vivem em todos os ambientes terrestres, mesmo em ambientes hostis, como solos salinos e solos e solos poluídos por elementos potencialmente tóxicos (FERROL; LANFRANCO, 2020; MALICKA *et al.*, 2022; HAN *et al.*, 2023; FERROL *et al.*, 2016). Estudos têm apontado o aumento da tolerância de plantas submetidas a ambientes poluídos por metais e compostos orgânicos uma vez colonizadas por esses fungos, estimulando também as atividades de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos (ALENCAR, 2016; MALICKA *et al.*, 2022).

A inclusão dos FMAs nas estratégias de fitorremediação deve tornar-se uma prioridade, não só porque a presença desses organismos favorece a sobrevivência da planta ao solo poluído, como também poderá potencializar a incorporação de carbono ao solo (SEHOANE *et al.*, 2023). Considera-se, portanto, que a identificação de FMAs com potencial biorremediador em áreas impactadas são alternativas promissoras na recuperação dessas áreas e pesquisas têm avançado para melhor compreensão da tolerância dos vegetais colonizados por FMAs em manguezais (HERATH *et al.*, 2021).

A identificação das espécies de Glomeromycota se baseia principalmente na caracterização morfológica dos esporos, porém a presença de esporos inviáveis ou

imaturos torna a identificação morfológica limitada (GOTO; COSTA; MAIA, 2009; OEHL *et al.*, 2011). A combinação de estudos moleculares e morfológicos tem sido apontada como a metodologia mais adequada para classificar os FMA e descrever sua distribuição geográfica (COFRÉ *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2022; LEE; LEE; YOUNG, 2008; LEE *et al.*, 2020).

Até o momento (Tabela 1), 3 classes de Glomeromycota, 5 ordens, 16 famílias e 49 gêneros e 314 espécies foram reconhecidos (WIJAYAWARDENE *et al.* 2020). Novas separações de gêneros e famílias podem ser esperadas em um futuro próximo, pois vários grupos de espécies ainda não foram analisados por métodos filogenéticos moleculares, especialmente das espécies de *Glomus* com esporos pequenos (GUO *et al.*, 2017).

Tabela 1: Representação das classes, ordens e famílias do Filo *Glomeromycota*. O número de gêneros em cada família é fornecido entre parênteses.

Filo	Classe	Ordem	Família	Espécie		
<i>Glomeromycota</i>			<i>Ambisporaceae</i> (1)	11		
	<i>Archaeosporomycetes</i>	<i>Archaeosporales</i>	<i>Archaeosporaceae</i> (3)	8		
			<i>Geosiphonaceae</i> (1)	1		
<i>Glomeromycetes</i>	<i>Diversisporales</i>		<i>Acaulosporaceae</i> (1)	57		
			<i>Diversisporaceae</i> (7)	34		
			<i>Pacisporaceae</i> (1)	7		
			<i>Sacculosporaceae</i> (2)	2		
			<i>Dentiscutataceae</i> (3)	15		
			<i>Gigasporales</i>	<i>Gigasporaceae</i> (1)	7	
	<i>Glomerales</i>		<i>Intraornatosporaceae</i> (2)	3		
			<i>Racocetraceae</i> (2)	21		
			<i>Scutellosporaceae</i> (3)	13		
			<i>Entrophosporaceae</i> (3)	10		
			<i>Glomeraceae</i> (17)	115		
			<i>Paraglomeromycetes</i>	<i>Paraglomerales</i>	<i>Paraglomeraceae</i> (2)	9
					<i>Pervetustaceae</i> (1)	1
Total	3	5	16 (49)	314		

Fonte: Adaptado Wijayawardene *et al.* (2020)

1.4.3. BACTÉRIAS

As comunidades microbianas em sedimentos de manguezais são caracterizadas por gradientes ambientais e biodisponibilidade de nutrientes (LAI *et al.*, 2022). As diferenças de micro-habitats nos sedimentos de manguezais variam a cada ciclo de maré, alterando os níveis de nutrientes como oxigênio e salinidade (DE

costeiras e são de alta abundância em sedimentos de manguezais funcionando como recicladores de nutrientes (LAI *et al.*, 2022).

As bactérias são necrófagas naturais e evoluíram para degradar ativamente os poluentes orgânicos, obtendo energia para seu metabolismo a partir de locais contaminados (THACHARODI *et al.*, 2023). Bactérias conhecidas por degradar hidrocarbonetos têm recebido mais atenção para aplicações biotecnológicas (REJINIEMON *et al.*, 2022). Na natureza, a biodegradação do óleo envolve uma sucessão de espécies com ampla capacidade enzimática dentro do consórcio microbiano e no geral preferem a degradação aeróbica por meio de uma via mediada pela oxigenase (MISLAN; GATES, 2019). As bactérias em geral preferem a degradação aeróbica dos HPAs, usando a via de oxidação do anel benzênico pelas enzimas dioxigenase e gerando intermediários dihidroxilados, que posteriormente será metabolizado em dióxido de carbono e água por meio de catecóis (TIWARI; KANG; BAE, 2023).

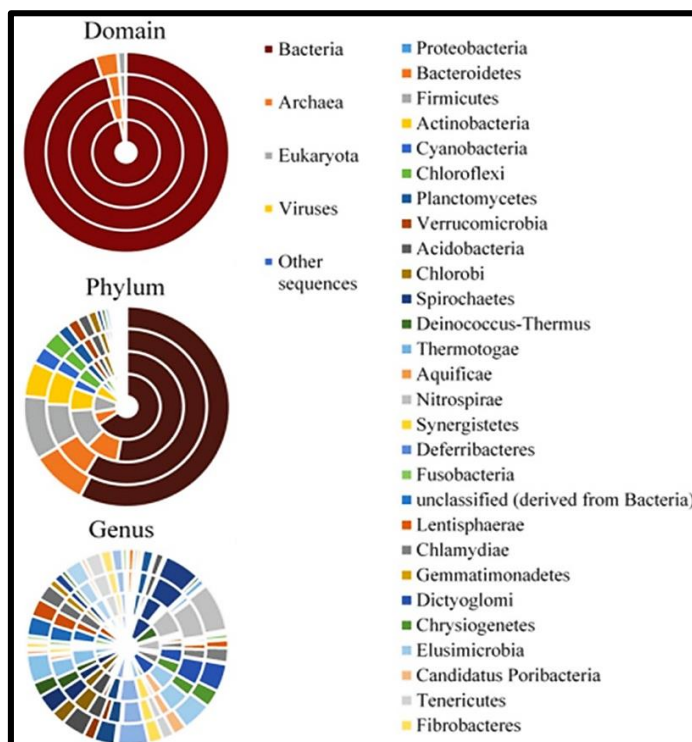
Os gêneros *Pseudomonas* e *Rhodococcus*, são os mais comumente relatados por oxidar HPAs, através das enzimas dioxigenases (IMAM *et al.*, 2022). Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, tais como *Rhodococcus sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Alcanivorax sp.* e *Sphingomonas sp.* foram isolados de sedimentos de mangue contaminados, demonstrando seu potencial biotecnológico para remediação (BRITO *et al.*, 2006). As bactérias das espécies *Bacillus spp.*, *Rhizobium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Ochrobactrum spp.* e *Brevundimonas spp.* podem utilizar o petróleo como fonte de carbono e energia quando em consórcio bacteriano (CHEQUER *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, técnicas moleculares de sequenciamento expandiram o acervo de microrganismos conhecidos por habitar sobre plantas, bem como no ambiente circundante (LUNDBERG *et al.* 2012). Neste contexto, a análise genômica ambiental tem permitido a identificação de comunidades microbiana de fungos e bactérias, capazes de representar uma proporção de 90 a 99,9% dos microrganismos (WIDADA; NOJIRI; OMORI, 2002).

Um estudo, analisando sedimentos de manguezais da Índia usando o sequenciamento *de nova* geração do metagenoma inteiro (NGS) comparou as estruturas taxonômicas e funcionais da comunidade com amostras metagenômicas de manguezais do Brasil e Arábia Saudita (Figura 15), o filo mais abundante nos manguezais dos três países foi Proteobacteria, seguido por Firmicutes e Bacteroidetes

(IMCHEN *et al.*, 2018). Alta abundância de genes envolvidos na resistência antibióticos como fluoroquinolonas e acriflavina, assim como genes resistentes a metais pesados, foram encontrados nas amostras de manguezais da Índia, Brasil e Arábia Saudita (IMCHEN *et al.*, 2018; SEPÚLVEDA-CORREA *et al.*, 2021).

Figura 15- Representação de distribuição de domínio, filo e gêneros de bactérias em manguezais no Brasil.



Fonte: Modificado de IMCHEN *et al.* (2018).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade microbiana de FMAs e bactérias no sedimento rizosférico e raiz de vegetais no Mangue de Pedra, Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, Brasil.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- I. Identificar a morfologia dos esporos de FMA encontrado nas amostras de rizosfera dos vegetais analisados através da técnica de peneiramento úmido.

- II. Realizar a caracterização molecular de FMA nas diferentes amostras de raiz e rizosfera dos vegetais coletados, através do sequenciamento nucleotídico por Sanger.
- III. Isolar cepas de bactérias das amostras de rizosfera e raiz dos vegetais através de cultivo.
- IV. Realizar a caracterização molecular das bactérias isoladas do cultivo, através do sequenciamento nucleotídico por Sanger.
- V. Comparar a diversidade de FMA e bactérias isoladas da rizosfera e raiz dos vegetais presentes nas diferentes áreas do Mangue de Pedra de Búzios.
- VI. Avaliar parâmetros físico-químicos e nutrientes nos diferentes pontos de coleta.

3. HIPÓTESE

O Mangue de Pedra da região de Armação dos Búzios possui uma grande diversidade microbiana, incluindo as variedades de FMAs e bactérias no sedimento rizosférico e nas raízes dos mangues, com potencial biotecnológico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) -Arraial do Cabo/RJ, Instituição Científica, Tecnológica e de Inovação (ICT-MB) subordinada ao Centro Tecnológico da Marinha no Rio de Janeiro (CTMRJ), nos Laboratórios de Biofilme e Biorremediação; Laboratório de Genética Marinha; Laboratório de Oceanografia Química e Geoquímica Ambiental, em parceria com o Instituto Federal Fluminense-IFF, *Campus* Cabo Frio, Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental (LEMAM).

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O Mangue de Pedra, Praia da Gorda-Rasa possui extensão aproximada de 1.041 hectares, localizado nas coordenadas (22° 43'S e 41° 57' W), no município de

Armação dos Búzios (22° 74'S e 41° 88'W), porção leste do estado do Rio de Janeiro, área conhecida como Região dos Lagos (SANTOS, 2016).

Próximo ao manguezal encontra-se a Falha Pai Vitório, que representa o limite sul do Graben de Barra de São João (MOHRIAK *et al.*, 1990; SCHMITT, 2001).

Outra feição importante é que a falha na Praia da Gorda, ao norte do Mangue de Pedra, coincide com o limite do aquífero e da sucessão da vegetação de mangue (CICCO, 2018). O término abrupto do manguezal neste ponto, apresenta também um recuo da encosta em direção ao continente, dificultando a fixação da vegetação de mangue e à exposição da ação de ondas. Após este limite, a ocorrência de árvores de mangue só é observada novamente próximo à vila dos pescadores.

Cerca de 70 % da distribuição das espécies de mangue na praia da Gorda varia entre 4 a 6 metros de altura para *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn, e *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm, sendo esta última de maior abundância (OLIVEIRA, 2007; SANTOS, 2016). A presença do único espécime de *Rhizophora mangle* (L.– Rhizophoraceae) (Figura 16), não foi observada por outros autores que realizaram pesquisas de monitoramento no Mangue de Pedra, sugerindo, assim a recente colonização do espécime entre 2019 a 2020 (BOMFIM, *et al* 2019; OLIVEIRA, 2007).

Pioneira e sazonal, a gramínea *Spartina sp.* é observada ao lado da recente *Rhizophora mangle* no Mangue de Pedra. Esta gramínea coloniza regiões frontais de manguezais possibilitando os processos de sedimentação na presença de bancos areno-argiloso e acúmulo de lodo, e tem sido relatada como precursora de espécies arbóreas (MOURA *et al.*, 1998; FRUEHAUF, 2005).

Figura 16- Registro do único mangue vermelho e gramínea marinha *Spartina*, Praia da Gorda, Mangue de Pedra.



Fonte: Autora. Registro: Dezembro/2021.

4.2. AMOSTRAGEM

Distribuídas na linha entremarés do manguezal, amostras de raiz e rizosfera de quatro vegetais foram coletadas, totalizando oito amostras (Tabela 2). Na Estação (1) - o vegetal analisado foi o mangue *Avicennia schaueriana* (Stapf & Leechm), localizado em uma região mais abrigada do manguezal na presença de plântulas de mangue em desenvolvimento, algas e musgos, e ausente de construções no entorno. A Estação (2) - gramínea *Spartina* sp., e a Estação (3) - *Rhizophora mangle* (L. – Rhizophoraceae) estão localizados em uma clareira ausente de vegetais de mangue no seu entorno, e próximo a principal trilha de acesso do manguezal. A Estação (4) - o mangue *Avicennia schaueriana* (Stapf & Leechm), único mangue presente neste ponto, está situado próximo à Vila de Pescadores, e ao riacho da Rasa.

As coletas foram realizadas em baixa maré no mês de maio de 2023 (Outono). As quatro estações (Figura 17) de amostragem foram georreferenciadas através do uso de aplicativo Bússola e GPS (Global Positioning System) da *Seong Eon Kim, Eonsoft* versão 5.5.9.

Figura 17 - Localização das estações de coletas no Mangue de Pedra de Búzios. Na Estação (1) o vegetal analisado foi o mangue *Avicennia schaueriana* Estação (2) gramínea *Spartina sp.* Estação (3) o mangue *Rhizophora mangle*. Estação (4) o mangue *Avicennia schaueriana*.

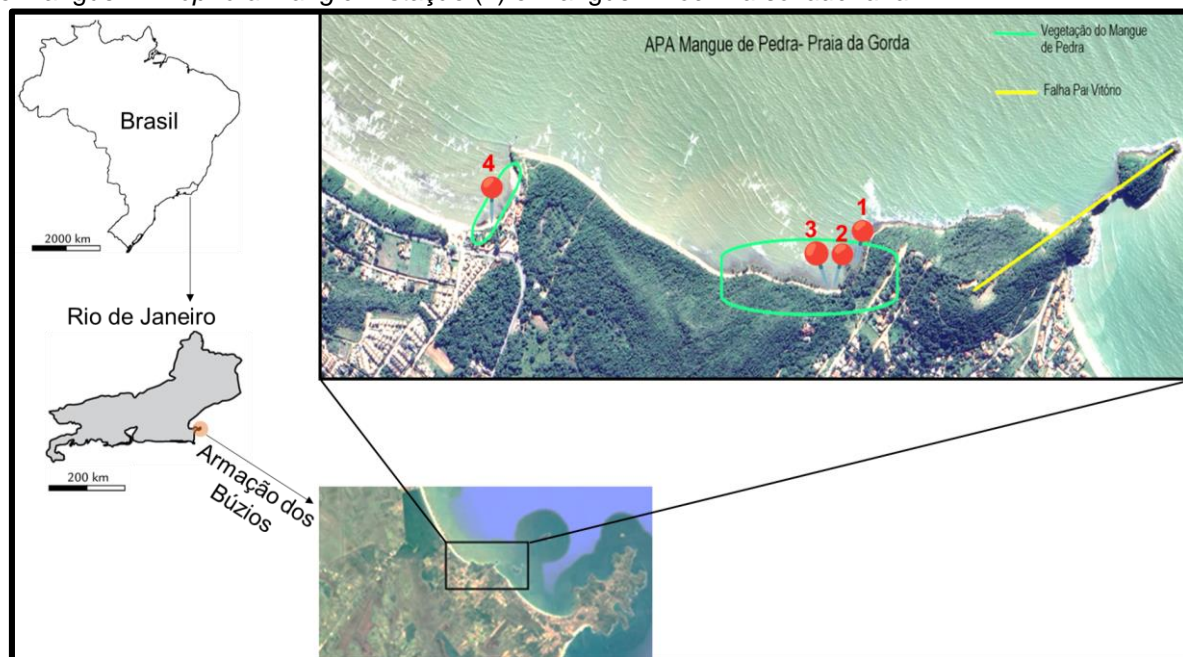


Tabela 2. Localização das estações de coleta próximo aos vegetais no Mangue de Pedra de Búzios.

Estações de coleta	Vegetais	Latitude (S)	Longitude (W)
1	<i>Avicennia schaueriana</i>	22° 43' 59"	41°57' 50"
2	<i>Spartina sp.</i>	22° 43' 60"	41°57' 52"
3	<i>Rhizophora mangle</i>	22° 43' 60"	41°57' 52"
4	<i>Avicennia schaueriana</i>	22° 43' 49"	41°58' 22"

4.2.1. COLETA DE ÁGUA

Amostras de água superficial foram coletadas nas quatro estações de coleta (Figura 18) entre 08h e 09h da manhã, em maré baixa. As amostras foram armazenadas em frascos de plásticos mantidos sobre refrigeração, sendo posteriormente encaminhadas para o Laboratório de Oceanografia Química e Geoquímica Ambiental da Marinha- IEAPM-Arraial do Cabo/RJ para análises químicas. Observado que ocorrerem chuvas nos dias anteriores da coleta.

Figura 18- Fotografias das Estações de coleta no Mangue de Pedra, Praia da Gorda, Búzios-RJ.



Fonte: Autora

4.2.2. COLETA DE SEDIMENTO RIZOSFÉRICO E RAIZ

Para análise de sedimento rizosférico e de raiz dos vegetais, amostras das 4 estações de coletas foram obtidas nas profundidades entre 5-10 cm, totalizando 8 amostras. Para coleta das amostras, foram utilizadas uma pá metálica e tesoura que ficaram imersas em álcool a 70%, sendo higienizados novamente a cada intervalo de amostragem. Todo o material coletado foi armazenado individualmente em saco plástico estéril, sendo acondicionadas sob refrigeração.

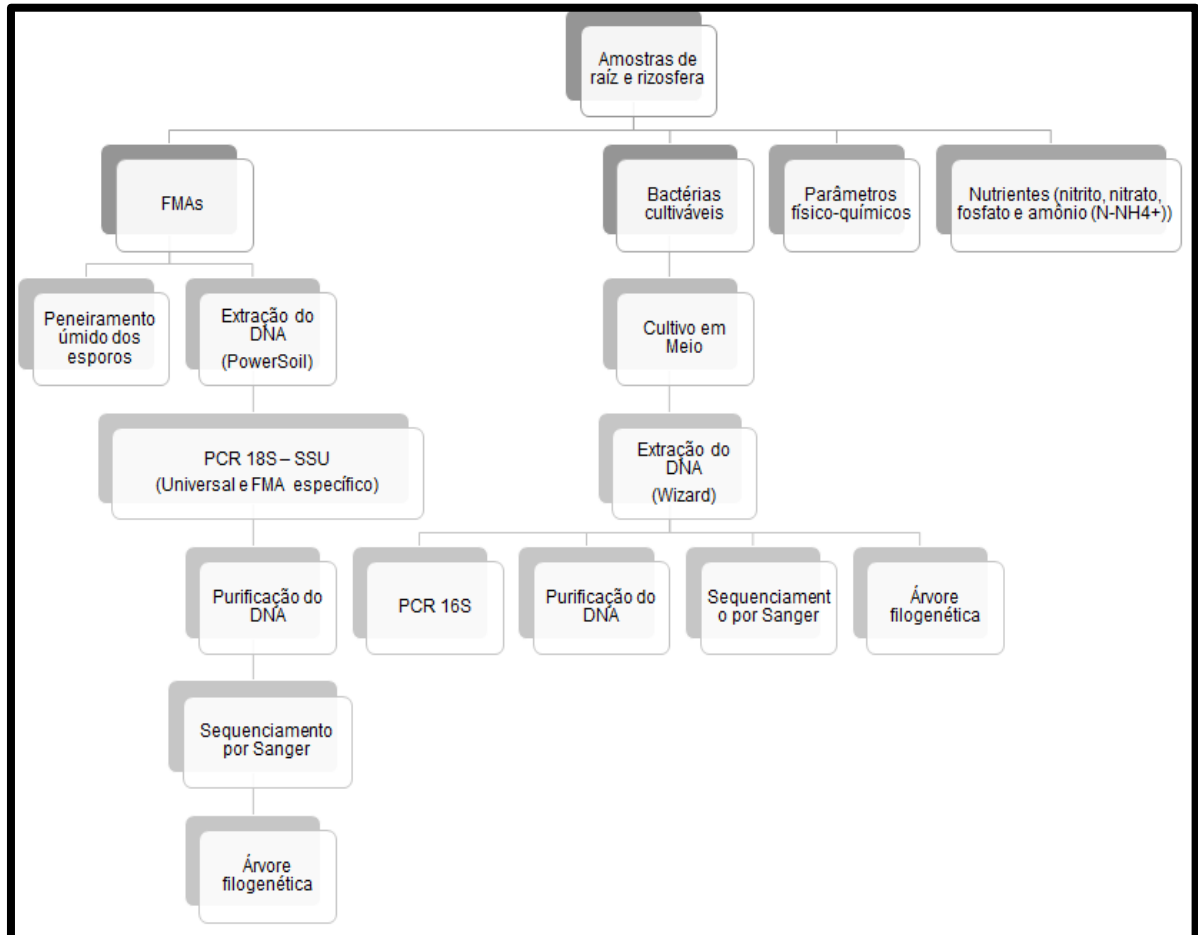
As amostras de sedimento rizosférico foram encaminhadas ao Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental (LEMAM-IFF) no Campus Cabo Frio-RJ para caracterização morfo-taxonômicas dos esporos de FMAs encontrados nas amostras.

Para análises moleculares, amostras de sedimento rizosférico e raízes foram encaminhadas ao laboratório de Genética no IEAPM, Arraial do Cabo-RJ

4.3. DESENHO EXPERIMENTAL

A (Figura 19) apresenta o fluxograma das metodologias empregadas neste estudo.

Figura 19- Fluxograma da sequência de experimentos realizados com as amostras de água, sedimento rizosférico e raiz do Mangue de Pedra em Armação de Búzios.



4.5. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os parâmetros físicos da água foram mensurados *in situ* nas quatro Estações utilizando-se o termômetro centígrado padrão de mercúrio para avaliação da temperatura (°C), refratômetro (Instruterm) para a análise de salinidade (‰) e identificação do pH na faixa de 0-14, o kit Universal indicador (Merck kGaA, 64271Darmstadt, Germany).

Amostras de água foram coletadas nas quatro Estações de coletas e encaminhados para o Laboratório de Oceanografia Química e Geoquímica Ambiental da Marinha- IEAPM, para análise de nutrientes.

A mensuração dos nutrientes foi fundamentada nas técnicas colorimétricas de acordo com *A Practical Handbook of Seawater Analysis* (STRICKLAND; PARSONS,

1972.). Os nutrientes nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), fosfato (PO_4^{3-}) e amônio (N-NH_4^+) foram quantificados de acordo com curvas de calibração, utilizando soluções padrões para obtenção dos resultados. O aparelho usado para determinação destes compostos foi um espectrofotômetro óptico (Spectronic 20D).

4.6. ANÁLISES DOS FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMAs)

4.6.1. MORFOTAXONOMIA DOS ESPOROS DE FMAs

No Laboratório do LEMAM-IFF foram analisados 100g de sedimento de rizosfera dos quatro pontos de amostragem para extração dos esporos de FMAs.

As amostras foram submetidas ao método de decantação e peneiramento úmido (Figura 20) utilizando peneiras com malhas de 450, 53 e 38 μc , seguido de centrifugação em água a 3000 rpm durante 3 minutos e, em seguida em solução de sacarose a 50% a 2000 rpm durante 2 minutos (GERDEMANN; NICOLSON, 1963; JENKINS, 1964).

Para contagem e visualização dos glomerosporos foi utilizado lupa estereoscópica (40x 180x) de aumento. Para observação da morfologia e tamanho dos esporos foram feitas lâminas com reagentes PVLG (álcool polivinílico-lactoglicerol) e PVLG + reagente MELZER, sendo observados por microscópio óptico (Novel BM 2100) acoplado à câmera de captação de imagens (Toup CAM UCMOS05100KPA). As imagens foram realizadas no programa *Toup View* e tratadas no *Programa Toup Lite e Image J*.

Figura 20- Na sequência, peneiramento úmido, centrifugação e separação dos glomerosporos dos sedimentos rizosféricos.



Fonte: Autora

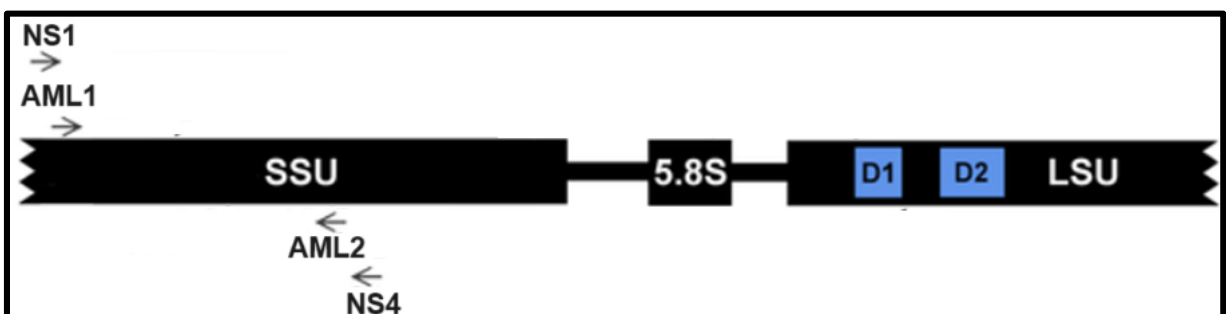
Glomerosporos após serem montados em lâmina de vidro foram observados ao microscópio de luz (100x). A identificação taxonômica foi feita em nível de Família e Espécie, com base na *International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi* (INVAM; SCHENK; MORTON, 1985). Os caracteres morfológicos avaliados foram: hifa de suporte, parede do esporo (cor, consistência, camadas, presença de ornamentação, presença de saco esporogênico e presença de escudo germinativo).

4.6.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS FMAs

4.6.2.1. EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS E PCR

No Laboratório de Genética do IEAPM foi realizada inicialmente a extração dos ácidos nucleicos contidos nas amostras de sedimento rizosférico e raiz das oito amostras usando o kit *DNeasy® PowerSoil®* (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. O marcador molecular rotineiramente utilizado para caracterizar as comunidades fúngicas é o espaçador interno transcrito ribossomal (ITS), porém esta subunidade sozinha não é eficiente para FMAs devido à alta taxa de variabilidade e inespecificidade para FMA (DELAUVAUX *et al.*, 2022; MALICKA *et al.*, 2022). Nesse contexto, a pequena porção SSU rDNA (Figura 21) é a região comumente usada para sequenciamento ambiental pra FMA, onde seu banco de dados é mais bem desenvolvido e confiável por está evoluindo mais lentamente que a região (ITS), sendo apoiado para construir árvores filogenéticas para inserção de clados (FRANCK *et al.*, 2020; ÖPIK *et al.*, 2013).

Figura 21- Regiões para amplificação de nrRNA de subunidade pequena (SSU) e nrRNA de subunidade grande (LSU).



Fonte: Adaptado de ASEMANNINEJAD *et al.* (2016).

A região amplificada do DNA utilizada foi da extremidade 5' do gene 18S do fragmento de 800pb rRNA ribossômico Small SubUnit (SSU rRNA) conforme

(SEHOANE *et al.*, 2023) e adaptações. As amplificações por PCR foram realizadas individualmente no DNA extraído de sedimento rizosférico e raízes de vegetal do Mangue de Pedra. Uma primeira PCR foi realizada usando *primers* fúngicos universais NS1-NS4 (5' GTA GTC ATA TGC TTG TCT C 3' - 5' CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG 3'; Síntese Biotecnologia) e uma segunda PCR com *primers* específicos AML1-AML2 (5'ATC AAC TTT CGA TGG TAG GAT AGA 3' - 5' GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC C 3'; Síntese Biotecnologia). Ambas as PCRs foram realizadas usando 0,2 µl (5U/µl) de Taq Platinum polimerase (Invitrogen), 0,5µ dNTPs (10mM) (Promega), 0,75 µl MgCl₂ (50Mm) e 1,25 µl de cada primer (NS1/4 e AML1/AML2) em um volume final de 20 µl. Os produtos de PCR foram analisados realizando uma eletroforese em gel em agarose 1,5% com SYBR Safe DNA (Invitrogen) a 100 V por 30 min e depois observados sob luz UV. Os produtos de PCR positivos (amplicons de tamanho de 800 pb) foram limpos pela técnica de purificação utilizando o kit *Purification Genomic DNA Wizard*®.

4.6.2.2. PURIFICAÇÃO, AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E QUANTIFICAÇÃO DO DNA E SEQUENCIAMENTO 18S

O produto da PCR foi purificado com *Wizard*® *SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. As análises de sequenciamento foram realizadas na Plataforma de Sequenciamento de DNA (PSEQDNA-UFRJ) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, utilizando o Sequenciador Automático SeqStudio™ (AppliedBiosystems – ThermoFisher). Os dados originados pelo sequenciamento foram editados manualmente com o programa BioEdit (versão 7.2.5). Os picos dos eletroferogramas foram avaliados e as porções iniciais e finais das sequências foram removidas por possuírem baixa qualidade, na maioria das vezes. As sequências obtidas após edição (com cerca de 800pb) foram comparadas com sequências depositadas em bases de dados de acesso público *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com o uso da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) (ALTSCHUL *et al.*, 1990). As sequências foram alinhadas e as análises evolutivas foram realizadas no software MEGA 11 (versão 11.0.13) (Tamura *et al.*, 2021). A história evolutiva e árvore filogenética foram construídas usando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo geral reversível de tempo (GTR) com distribuição gama (+G= 2.0774) em 1000 réplicas. Amostras cadastradas

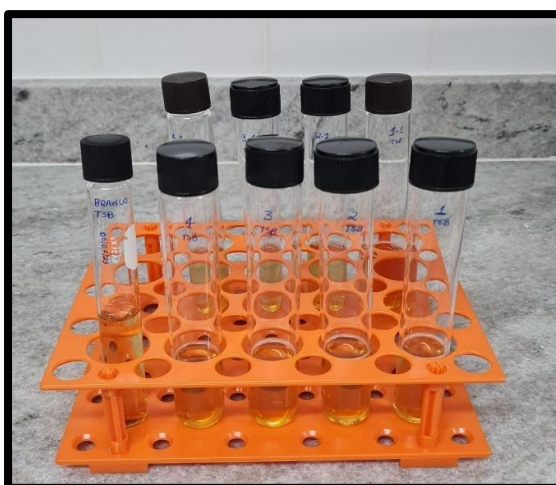
no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) do Ministério do Meio Ambiente (MMA): Cadastro de Acesso Número AF93758.

4.7. ANÁLISES DAS BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS

4.7.1. CULTIVO E ISOLAMENTO DAS CEPAS

O isolamento das bactérias presentes nos sedimentos da rizosfera e na raiz dos vegetais foi realizado no Laboratórios de Biofilme e Biorremediação do IEAPM. Aproximadamente 1g de amostra foi macerado e ressuspenso em 5mL da solução estéril de NaCl (0,9%). Foram inoculados 100 μ L de cada amostra em tubos de vidro, contendo o meio líquido de Caldo triptona de soja (TSB) (Figura 22). O TSB é um meio de amplo espectro usado para o cultivo de inúmeros microrganismos (WANGER *et al.*, 2017).

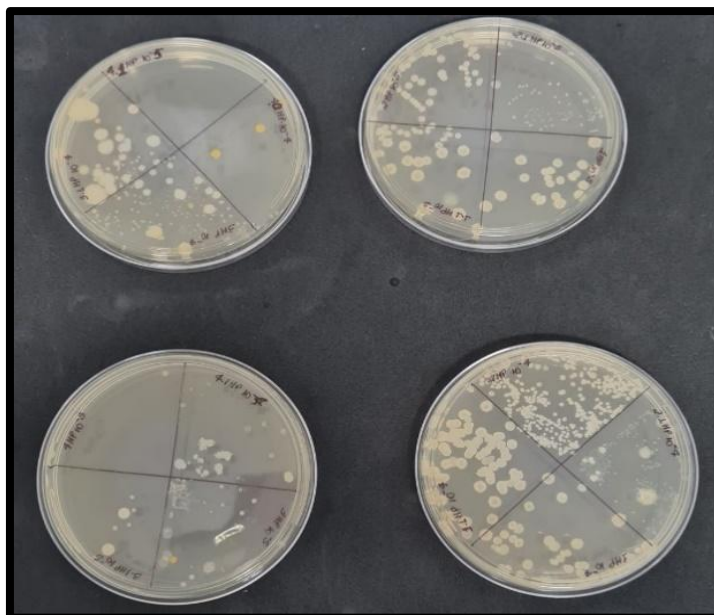
Figura 22- Cultivo bacteriano das amostras coletadas do Mangue de Pedra em Caldo triptona de soja (TSB) líquido.



Fonte: Autora

Após verificação e acompanhamento por densidade ótica (630nm) do crescimento bacteriano, cada amostra foi diluída seriadamente (10^{-1} até 10^{-5}) e inoculada em placas de Petri pelo método de espalhamento (Spread-Plate) com o auxílio de uma alça de Drigalski (Figura 23). Cada placa foi preparada previamente com 20mL dos respectivos meios com adição de Ágar 1,5% (v/v).

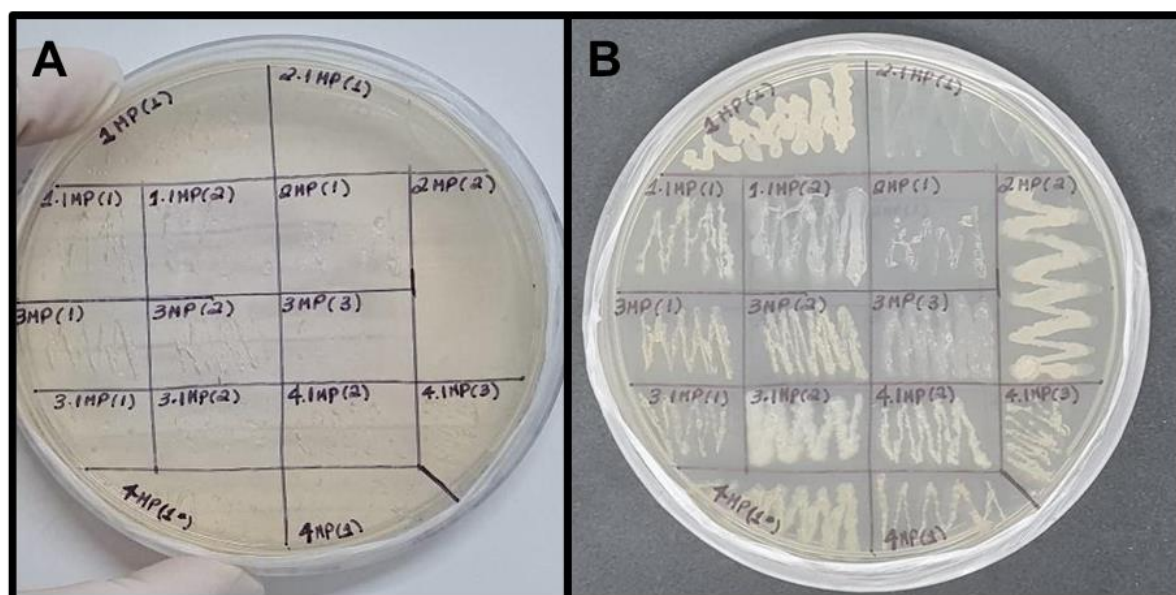
Figura 23. Placas de Petri com formação de colônias em meio sólido ágar das amostras extraídas do Mangue de Pedra.



Fonte: Autora

As colônias bacterianas foram observadas nas respectivas placas das diluições 10^{-5} e selecionadas para o isolamento de culturas puras através da técnica de esgotamento de estrias simples (Figura 24) em placas de Petri. As colônias foram inicialmente isoladas por características morfológicas, incubadas na estufa a por até 48h. Com uma alça microbiológica, cada cultura pura bacteriana isolada do meio ágar, foi inoculada novamente em meio TSB líquido e incubada a 30°C por 24h. Posteriormente, 1mL de cada amostra foi transferido para microtubos de 1,5mL e encaminhados a análise molecular e aliquotadas em criotubos para congelamento e armazenagem em Glicerol 30% no banco de bactérias no IEAPM a -70°C .

Figura 24- Isolamento de culturas bacteriana puras do sedimento rizosférico e raiz dos vegetais do Mangue de Pedra através da técnica de esgotamento de estrias simples. A) Placa inoculada no tempo zero. B) Placa após o período de 24h de incubação a 30°C.



Fonte: Autora

4.8.1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS

4.8.1.1. EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS E PCR

Para a identificação molecular, o genoma total das bactérias selecionadas foi extraído com um kit comercial no laboratório de Genética Marinha do IEAPM. O kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega) foi utilizado e o procedimento realizado conforme as instruções do fabricante, obtendo-se no final da extração 25µL de DNA eluído.

A concentração e pureza do DNA extraído foi verificada usando o espectrofotômetro *NanoDrop® 2000* (*Thermo Scientific*) e a integridade do DNA avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%.

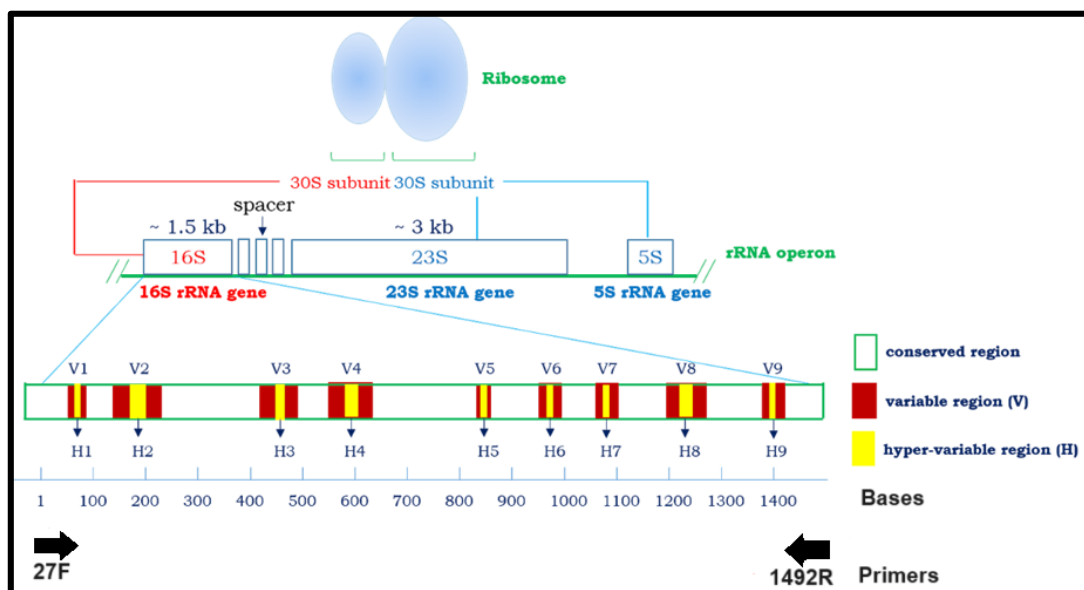
Após a extração de DNA, o gene rRNA 16S (Figura 25) foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) conforme (SUSILOWATI; SABDONO; WIDOWATI, 2015), usando os primers universais 27F e 1492R segundo (WEISBURG *et al.*, 1991) (Tabela 3) no termociclador modelo Veriti™ 96-Well *ThermoFischer Scientific*.

Tabela 3. Primers utilizados para avaliar a comunidade microbiana das amostras pela técnica de PCR.

Primer	Posição das bases ¹	Região alvo 16S rRNA	Sequência do primer
27F	8-27	V1	5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
1492R	1492-1513	V9	5'TACGGTTAACCTTGTACGACTT-3'

¹Posição referente à sequência do gene ribossomal RNAr 16S.

Figura 25. Ilustração das regiões variáveis do gene 16S rRNA e dos diversos pares de primers usados na sequenciação de amostras simuladas. Regiões conservadas estão em azul, variáveis em verde, e os amplicons de cada plataforma de sequenciação em cinza.



Fonte: Modificado de PARK *et al.* (2021).

A reação de PCR em 15µL de volume consistiu em *GoTaq®Green Master Mix Promega 2X* (7,5µL), primer 27F e 1492R na concentração de uso de 10µM (1µL de cada), DNA extraído 15-25 ng (5µL) e água ultrapura (0,5µL). Foram usadas as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min. Uma extensão final foi realizada a 72 °C por 7 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a amplificação dos fragmentos em 1500 pares de base (pb). O gel de agarose a 1 % foi preparado em tampão TBE 1X e 2µL de corante Safer 10000X (Kasvi). As amostras (2µL) foram aplicadas no gel após gelificação e as corridas de eletroforese realizadas a 80V, durante 40 minutos em cuba de eletroforese com o tampão TBE 1X. Posteriormente, o gel foi observado com E-Gel™ Imager UV Light Base *ThermoFisher Scientific*.

4.8.1.2. SEQUENCIAMENTO 16S

O produto da PCR foi purificado com *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. As análises de sequenciamento foram realizadas na Plataforma de Sequenciamento de DNA (PSEQDNA-UFRJ) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, utilizando o Sequenciador Automático *SeqStudio™* (*AppliedBiosystems – ThermoFisher*). Os dados originados pelo sequenciamento foram editados manualmente com o programa BioEdit (versão 7.2.5).

Os picos dos eletroferogramas foram avaliados e as porções iniciais e finais das sequências foram removidas por possuírem, majoritariamente, baixa qualidade, na maioria das vezes. As sequências obtidas após edição (com cerca de 1050pb) foram comparadas com sequências depositadas em bases de dados de acesso público Genbank ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) com o uso da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

As sequências foram alinhadas e as análises evolutivas foram realizadas no software MEGA 11 (versão 11.0.13) (TAMURA, 1992). A história evolutiva e árvore filogenética foram construídas usando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo Tamura-Nei com distribuição gama (+G = 0,5407) em 1000 réplicas. Amostras cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) do Ministério do Meio Ambiente (MMA): Cadastro de Acesso Número ACB699E.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As propriedades físico-químicas do solo e da água marinha foram mensuradas em quatro pontos distribuídos no Mangue de Pedra (Tabela 4). Os valores de pH foram similares em todas as estações de coleta, na faixa do neutro (7). Os parâmetros temperatura e salinidade apresentaram valores médios de 26°C e 25%, respectivamente. Em relação aos nutrientes avaliados, as concentrações médias observadas de amônia, nitrito, nitrato e fosfato foram: 8.724, 0.459, 7.279 e 0,540µM.

As menores e maiores mensurações de temperatura, temperatura e concentrações de nutrientes (amônia, nitrito e nitrato), foram observadas nas estações de coleta 1 e 4, respectivamente. Sendo observado o inverso, apenas nas concentrações de fosfato, onde a estação 1 apresentou concentrações mais elevadas e a estação 4 menores concentrações. A estação de coleta 3 apresentou a menor concentração do mineral fosfato comparado aos demais pontos.

Tabela 4: Parâmetros físico-químicos nas estações de coleta no Mangue de Pedra.

Estações de coleta	Vegetal	Nutrientes (μM)				Físico-químicos		
		Amônia	Nitrito	Nitrato	Fosfato	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Salinidade (‰)	pH
1	<i>Avicennia Schaueriana</i>	2,906	0,068	3,234	0,808	24	23	7
2	<i>Spartina sp.</i>	9,309	0,378	5,028	0,582	26	23	7
3	<i>R. mangle</i>	9,868	0,430	7,982	0,231	25	24	7
4	<i>Avicennia Schaueriana</i> *	12,813	0,958	12,873	0,538	27	28	7

* *Avicennia Schaueriana* localizada próximo à Vila de Pescadores.

5.2. FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

5.2.1. MORFOTAXONOMIA DOS ESPOROS

A identificação morfotaxonomica no presente estudo foi realizada com ajuda de especialistas em taxonomia de FMA, analisando os seguintes caracteres morfológicos: hifa de suporte, parede do esporo (cor, consistência, camadas, presença de ornamentação), presença de saco esporogênico, presença de escudo germinativo e tamanho. Foi realizada consulta complementar de literatura específica no banco de dados do site *International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi* (INVAM).

Glomerosporos foram encontrados nas amostras de 100g de sedimentos rizosféricos em todas as estações de coleta (Tabela 5). Foram identificadas famílias Glomeraceae e Acaulosporaceae. Em nível de espécie foram identificadas *Funneliformis aff. mosseae* e *Paraglomus aff. occultum*, nas estações de coleta 1 e 4, respectivamente.

Tabela 5. Resultado morfotaxônomica dos esporos de FMAs encontrados nas rizosferas das 4 Estações de coleta no Mangue de Pedra, Armação dos Búzios.

Estações de coleta	Vegetal	Número de esporos	Famílias	Espécie
1	<i>Avicennia Schaueriana</i>	37	<i>Glomeraceae</i>	<i>Funneliformis aff. mosseae</i>
2	<i>Spartina sp.</i>	26	<i>Glomeraceae</i>	x
3	<i>R. mangle</i>	25	<i>Glomeraceae</i>	x
4	<i>Avicennia Schaueriana</i>	25	<i>Glomeraceae</i> <i>Acaulosporaceae</i> <i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus aff. occultum</i>

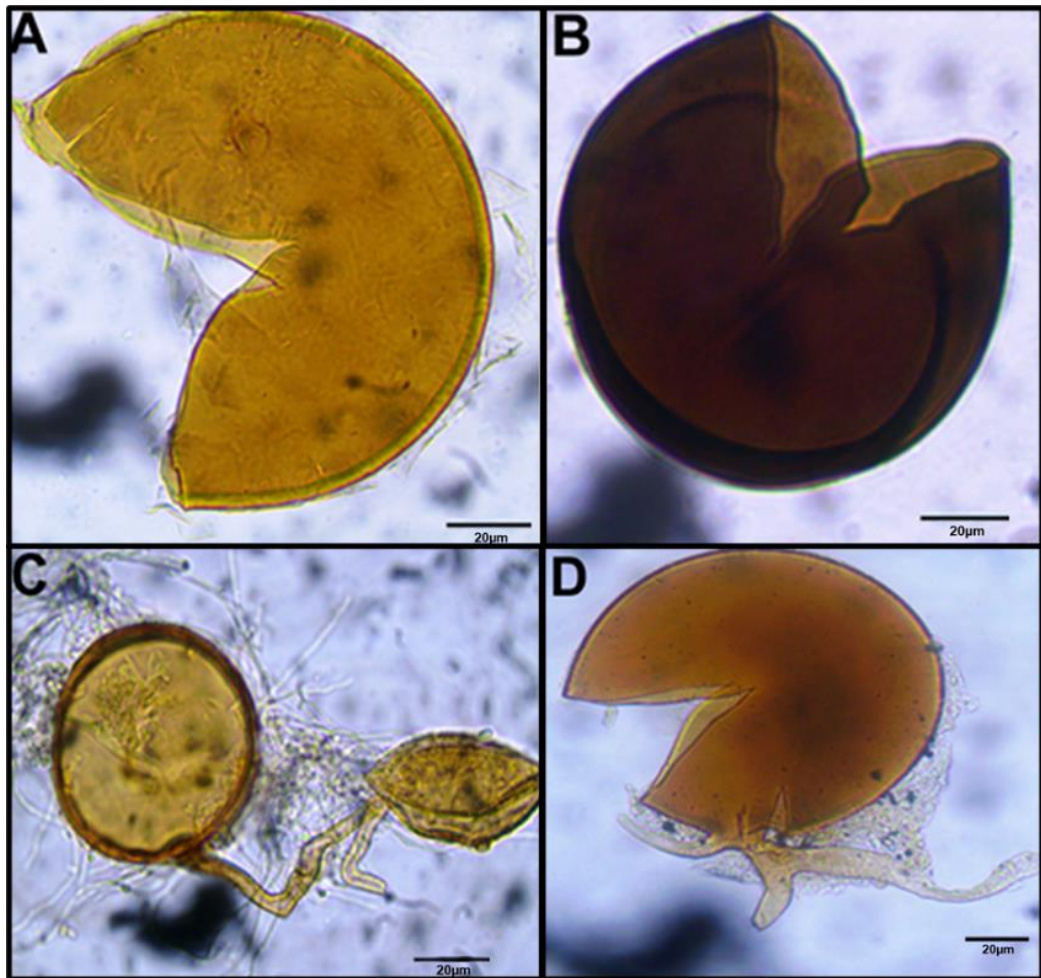
O glomerosporo *Funneliformis aff. mosseae* isolado no sedimento rizosférico da estação de coleta 1, no mangue *Avicennia schaueriana* (Figura 26) possui tamanho aproximado de 100µm. Sua distribuição de tamanho relatado na literatura é 100-260µm, média =195µm (n=166). A hifa esporígena mais clara que a parede do esporo; o poro é ocluído por septo curvo, a partir da camada mais interna L3. A camada L1 aparenta ser uma parede expansiva (que em contato com o PVLG se expande).

Figura 26. A) Glomerosporo *Funneliformis aff. mosseae* isolado do sedimento rizosférico do mangue *Avicennia schaueriana* (Estação de coleta 1). Lente com aumento 1000x, barra de escala= 20µm. B) Glomerosporos da Família *Glomeraceae* isolado do sedimento rizosférico do mangue *Avicennia schaueriana* (Estação de coleta 1) no Mangue de Pedra, Armação dos Búzios, sob lente com aumento 1000x, barra de escala= 20µm.



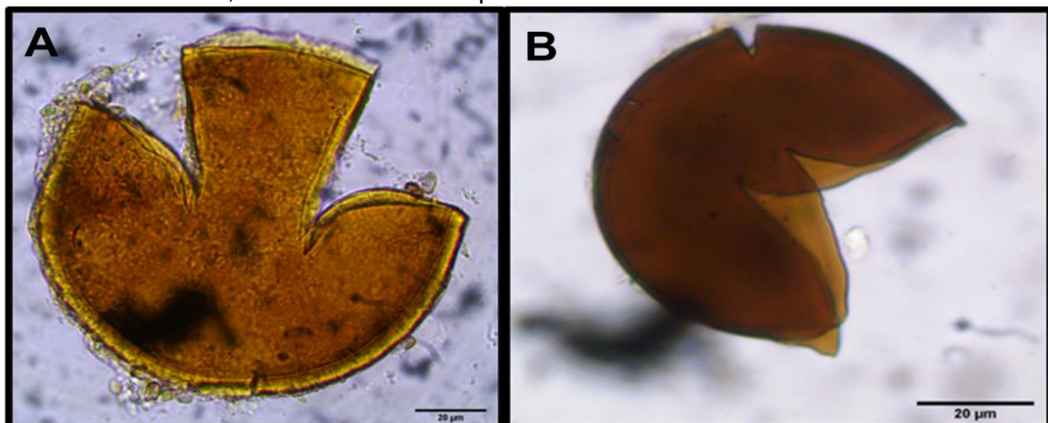
Fonte: Autora

Figura 27. Glomerosporos da família *Glomeraceae* isolados no sedimento rizosférico da Gramínea marinha *Spartina* na (Estação de coleta 2) no Mangue de Pedra, Armação dos Búzios. As imagens de A-C com aumento de 1000x e D com aumento de 400x, barra de escala= 20µm.



Fonte: Autora

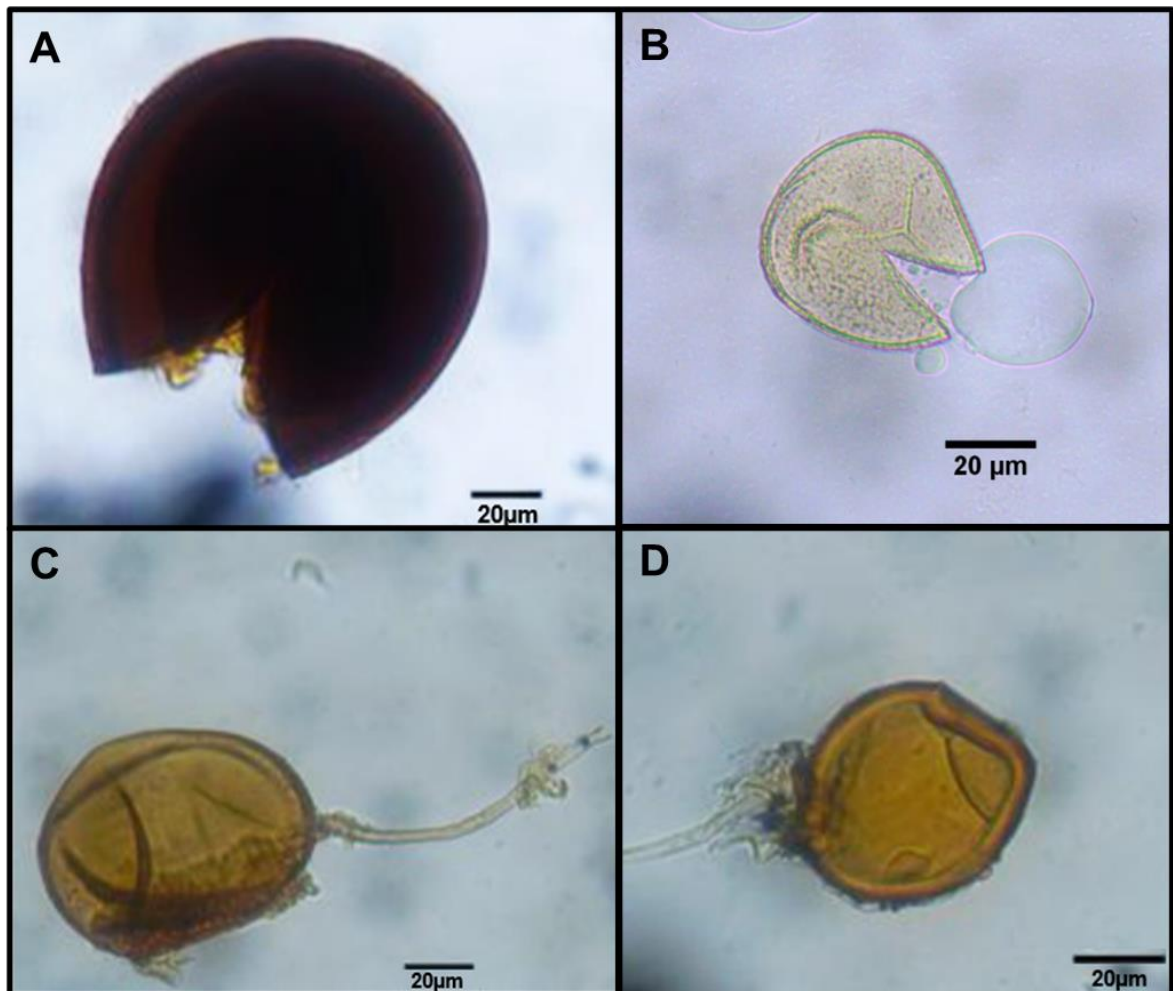
Figura 28- Glomerosporos da Família *Glomeraceae* isolados no sedimento rizosférico da *Rhizophora mangle* no (Estação de coleta 3) no Mangue de Pedra, Armação dos Búzios. Imagens capturados sob lente com aumento 1000x, barra de escala= 20µm.



Fonte: Autora

O único esporo do gênero *Paraglomus* sp. sem a hifa observada (Figura 29B) dificulta a identificação e comparação das estruturas com outros esporos desta espécie. Porém a caracterização molecular identificou no Mangue de Pedra a existência de *Paraglomus occultum*. O tamanho aproximado de 50 μm está abaixo do tamanho médio mínimo (60-100 μm) relatado na literatura. Para preservar possíveis equívocos específicos, optou-se a descrição por *Paraglomus aff. occultum*.

Figura 29. Glomerosporos isolados na (Estação de coleta 4) *Vila dos pescadores*, do sedimento rizosférico da *Avicennia schaueriana*, Mangue de Pedra, Armação dos Búzios. As imagens A e B foram capturadas sob lente de aumento de 1000X e as C e D sob lente de aumento de 400X. A) Família Acaulosporaceae. B) *Paraglomus aff occultum*. C-D) Família Glomeraceae.



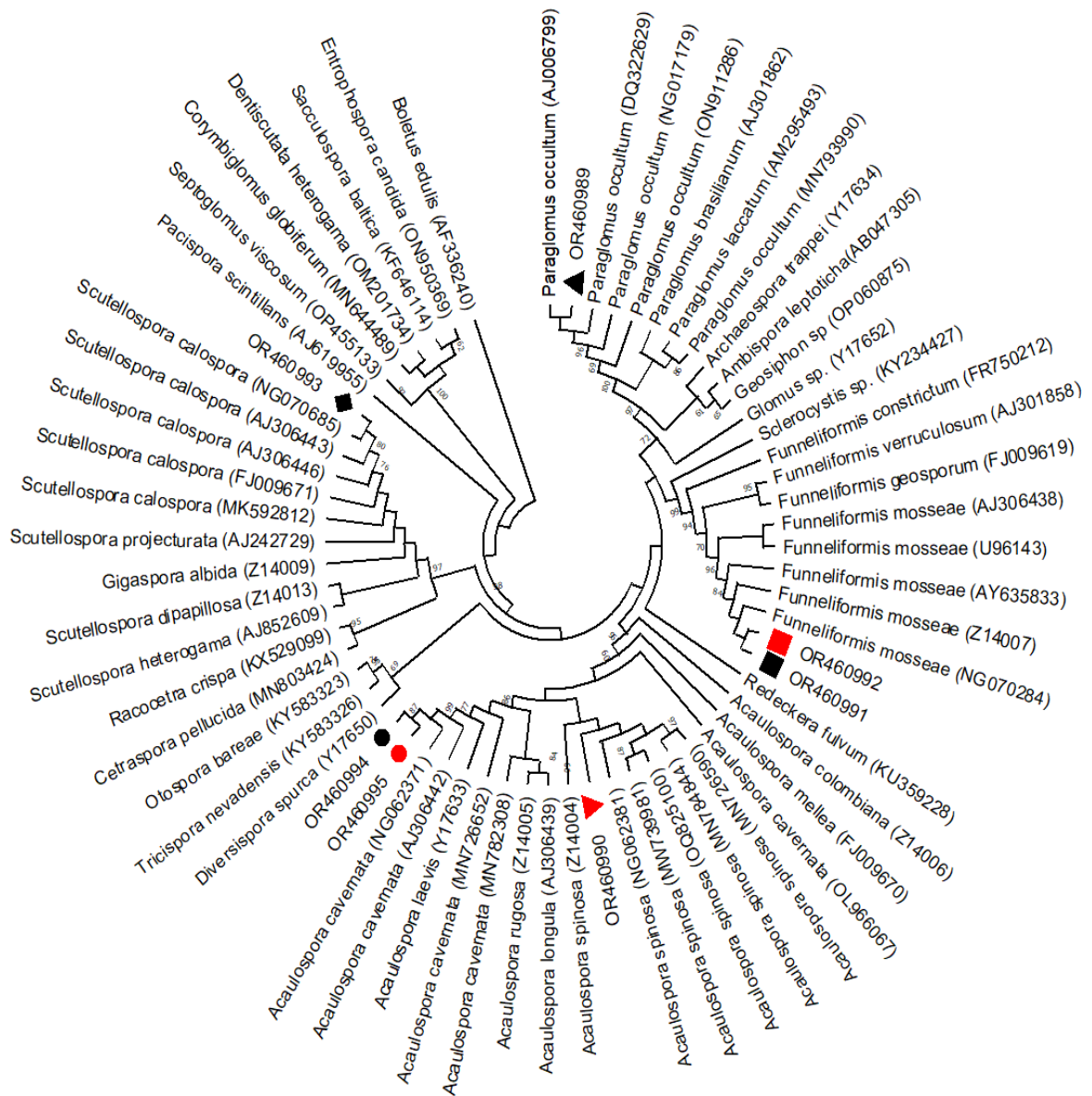
Fonte: Autora

5.2.2. IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA MOLECULAR de FMA

A árvore (Figura 30) filogenética foi montada com base nas sequências de RNAr 18S das linhagens de FMA isoladas das amostras do Mangue de Pedra. As sequências foram alinhadas e as análises evolutivas foram realizadas no software MEGA 11 (versão 11.0.13). A história evolutiva e árvore filogenética foram construídas usando o modelo evolutivo de substituição, Método de Máxima Verossimilhança de reconstrução evolutiva, com 1000 Bootstraps e valores de suporte acima de 60%. Os resultados moleculares para fungos Glomeromycota do Mangue de Pedra mostrou a presença das espécies *Paraglomus occultum* (C. Walker) J.B. Morton & D. Redecker, *Acaulospora spinosa* C. Walker & Trappe, *Funneliformis mosseae* (T.H. Nicolson & Gerd.) C.Walker & A. Schüssler, *Scutellospora calospora* (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders, *Acaulospora cavernata* Blaszk.

No ponto 1, na rizosfera e na raiz do mangue *Avicennia schaueriana* foram identificados respectivamente *Paraglomus occultum* e *Acaulospora spinosa*. No ponto 2, foi identificado somente *Funneliformis mosseae* tanto na rizosfera como na raiz da gramínea *Spartina sp.* No ponto 3, foi identificado *Scutellospora calospora* somente na rizosfera, não sendo observado FMA na raiz do mangue *Rhizophora mangle*. Já no ponto 4 a espécie *Acaulospora cavernata* foi encontrada tanto na rizosfera como na raiz da *Avicennia schaueriana*.

Figura 30. Árvore filogenética de FMA pela análise parcial da região SSU-rRNA de seqüências diferentes de Glomeromycota. Usando o modelo evolutivo de substituição, Método de Máxima Verossimilhança de reconstrução evolutiva, com 1000 Bootstraps e valores de suporte acima de 60%. *Os números de acesso do Genbank de cada referência da seqüência são mostrados entre parênteses e nossas seqüências referentes a estação de coleta 1 (triângulo), 2 (quadrado), 3 (losango) e 4 (círculo). Os símbolos em preto e vermelho representam amostras da rizosfera e raiz, respectivamente. *Boletus edulis* foi usado como grupo externo.



Fonte : Autora

5.2. BACTÉRIAS

5.2.1. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS ISOLADAS

Tabela 6. Representação filogenética de 13 espécies e 11 gêneros bacterianos identificados no Manguê de Pedra.

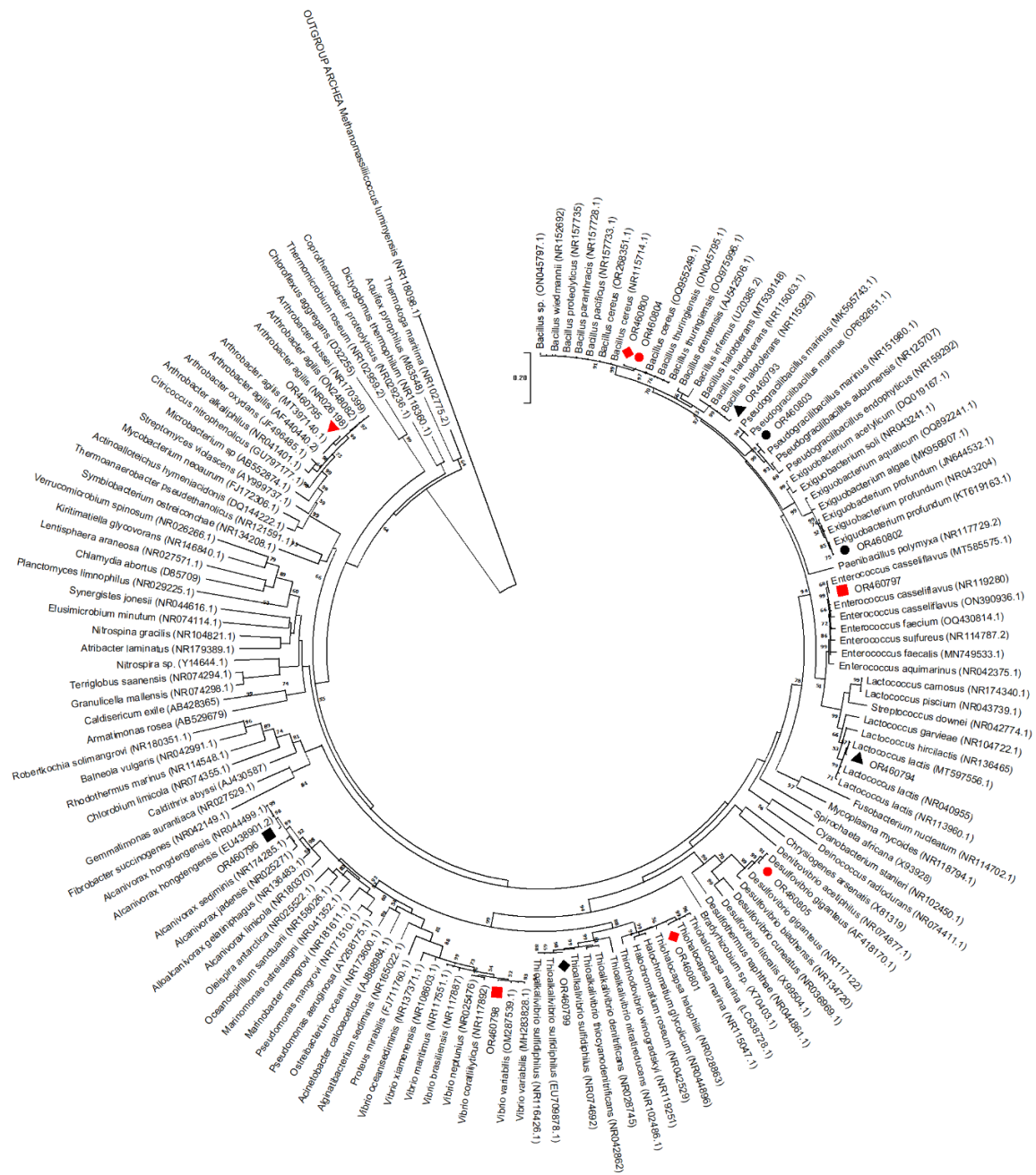
PONTOS DE COLETA	VEGETAL ANALISADO	CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA		
		ORDEM	GÊNERO	ESPÉCIES
1	<i>A. schaueriana</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus halotolerans</i>
		<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
		<i>Micrococcales</i>	<i>Arthobacter</i>	<i>Arthobacter agilis</i>
2	<i>Spartina sp.</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio variabilis</i>
		<i>Oceanospirillales</i>	<i>Acanirovax</i>	<i>Acanirovax hongdengensis</i>
		<i>Lactobacillales</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
3	<i>R. mangle</i>	<i>Chromatiales</i>	<i>Thioalkalivibrio</i>	<i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i>
			<i>Thiohalocapsa</i>	<i>Thiohalocapsa Marina</i>
		<i>Bacillales</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp.</i>
4	<i>A. schaueriana</i>		<i>Exiguobacterium</i>	<i>Exiguobacterium profundum</i>
		<i>Bacillales</i>	<i>Pseudogracibacillus</i>	<i>Pseudogracibacillus marinus</i>
			<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
		<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Desulfovibrio giganteus</i>

Um total de 13 cepas das colônias bacterianas isoladas em cultivo foram caracterizadas a nível de espécie através do sequenciamento parcial do gene codificador do RNAr 16S e da comparação com as sequências homólogas depositadas no banco de dados *GenBank*. Foram identificados molecularmente 11 gêneros bacterianos (Tabela 6), através do sequenciamento nucleotídico por Sanger: *Alcanivorax*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Desulfovibrio*, *Enterococcus*, *Exiguobacterium*, *Lactococcus*, *Pseudogracilibacillus*, *Thiohalocapsa*, *Thioalkalivibrio* e *Vibrio*.

No ponto 1 foi encontrado as espécies *Bacillus halotolerans* e *Lactococcus lactis* na rizosfera. Já na raiz do ponto 1 foi encontrado apenas *Arthrobacter agilis*. No ponto 2 foi encontrado *Alcanivorax hongdengensis* na rizosfera, e na raiz as espécies *Enterococcus casseliflavus* e *Vibrio variabilis*. No ponto 3, foi encontrada a espécie *Thioalkalivibrio sulfidiphilus* na rizosfera. Já na raiz as espécies encontradas foram *Bacillus sp* e *Thiohalocapsa marina*. No ponto 4, em sedimento rizosférico foi encontrado *Exiguobacterium profundum* e *Pseudogracilibacillus marinus*. Enquanto na raiz foi encontrado *Bacillus cereus* e *Desulfovibrio giganteus*.

A árvore filogenética (Figura 31) foi montada com base nas sequências de RNAr 16S das linhagens de bactérias isoladas das amostras do Mangue de Pedra. As sequências obtidas após edição (com cerca de 1050pb) foram comparadas com sequências depositadas em bases de dados de acesso público Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com o uso da ferramenta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tools*) (ALTSCHUL *et al.*, 1997). As sequências foram alinhadas e as análises evolutivas foram realizadas no software MEGA 11 (versão 11.0.13). A história evolutiva e árvore filogenética foram construídas usando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo Tamura-Nei com distribuição gama (+G = 0,5407) em 1000 réplica.

Figura 31. Árvore filogenética de bactérias pela análise parcial da região 16S construída usando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo Tamura-Nei com distribuição gama (+G = 0,5407) em 1000 réplica. Estação de coleta 1 (triângulo), 2 (quadrado), 3 (losango) e 4 (círculo). Os símbolos em preto e vermelho representam amostras da rizosfera e raiz, respectivamente. *Methanomassiliococcus luminyensis* foi usado como grupo externo.



Fonte : Autora

6. DISCUSSÃO

Apesar das poucas medidas realizadas, de uma maneira geral os valores das propriedades físico-químicas do solo e da água marinha mensuradas em quatro pontos distribuídos no Mangue de Pedra (salinidade, pH, temperatura e nutrientes) no presente estudo, apresentaram valores similares. Dessa forma, diferenças observadas na composição microbiana entre as estações de coleta não podem ser atribuídas diretamente as condições ambientais, mas provavelmente a possíveis interações sinérgicas entre os fatores ambientais medidos e aos fatores bióticos do Mangue da Pedra.

Pesquisas em florestas de mangue tem demonstrado que comunidades microbianas são influenciadas pelas condições de diferentes fatores bióticos e abióticos (BERG; SMALLA, 2009; DE SANTANA *et al.*, 2021; LAI *et al.*, 2022).

Fatores como idade da planta, tipo de raiz, tamanho do grão do solo, níveis de pH, salinidade e temperatura, possuem grande papel na determinação da diversidade microbiana influenciando a predição da dominância fúngica-bacteriana em manguezais (HELFER; HASSENRÜCK, 2021; LAI *et al.*, 2022). No entanto, a maioria dessas pesquisas foram realizadas em manguezais de sedimento lamoso sob paisagens ribeirinhas e deltas. Neste estudo, fornecemos as primeiras informações de comunidades bacterianas e de FMAs associados a vegetais do Mangue de Pedra, que cresce sobre substrato areno-rochoso e ausente de rio.

A salinidade tem sido relacionada como um dos principais fatores na diversidade e estrutura das comunidades microbianas em sedimento costeiro como taxa de colonização, riqueza e dominância de certas linhagens, sendo maior quando em salinidade intermediária (BARIK *et al.*, 2018; LAI *et al.*, 2022; BERNHARD *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2015).

No Mangue de Pedra, os valores entre (23 - 28) ppt. indicam um ambiente salobro de salinidade intermediária. Ambientes de mangue que apresentam alta salinidade correspondem à faixa entre (33 - 64) ppt, assim como salinidade intermediária apresentam valores entre (10 - 30) ppt (BARIK *et al.*, 2018; BERNHARD *et al.*, 2005; LAI *et al.*, 2022).

Pesquisas de monitoramento hidroquímico realizadas no Mangue de Pedra, revelaram que o caráter das águas do manguezal é majoritariamente cloretada-sódica com baixos teores de bicarbonato caracterizado pela água do mar quando na presença de águas continentais, as quais promovem a diluição da salinidade tornando-a salobra (CICCO, 2018; REBELO, 2013; BENFEITA, 2017). Neste contexto, os resultados para salinidade das diferentes estações de coleta deste trabalho, corroboram com os citados na literatura, e provavelmente não explicam por si, devido a sua pequena variação quando comparadas com outros manguezais, as variações da composição microbiana verificada no Mangue de Pedra.

O segundo condutor da estrutura microbiana depois da salinidade é o pH, atuando como fator limitante das atividades do metabolismo (CECCON *et al.*, 2019). Nossos resultados para pH apresentaram na faixa do neutro, corroborando com pesquisas anteriores que demonstraram a influência de ácidos minerais e alcalinidade formada a partir de bicarbonatos nas poças de maré do Mangue de Pedra (REBELO, 2013; BENFEITA, 2017).

Os níveis de pH dos sedimentos de manguezais são relativamente uniformes, com uma variação relatada de 5 a 8,09 dependendo das zonas de maré, estações do ano e da zonation dos manguezais (LIU *et al.*, 2020; NATHAN; VIJAYAN; AMMINI, 2020; ZHU *et al.*, 2022). Em camadas estratificadas de sedimento de manguezais o valor médio de pH aumenta com a profundidade, tornando-se mais alcalino (FENG *et al.*, 2019).

Compreender a interação das populações microbianas e seu papel na ciclagem de nutrientes nas zonas de maré dos manguezais é essencial para a adaptação e conservação desses ecossistemas (DE SANTANA *et al.*, 2021; TRIVEDI *et al.*, 2020). Parâmetros ambientais influenciam as bactérias oxidantes de amônia, importantes no ciclo do nitrogênio nos manguezais (LAI *et al.*, 2022).

No Mangue de Pedra, observamos espécies bacterianas diazotróficas em todas as estações de coleta, tanto no sedimento rizosférico quanto nas raízes, como *Gammaproteobacteria*, *Actinomycetota* e *Desulfovibrionaceae* (ALFARO-ESPINOZA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2017). Esses diazotróficos são fundamentais para a reciclagem do nitrogênio, incluindo nitrificação, fixação, desnitrificação e remoção de amônia em ambientes eutrofizados de manguezais (WANG *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019; ALFARO-ESPINOZA *et al.*, 2015).

Todas as estações de coleta no Mangue de Pedra, exceto a estação 1, apresentaram valores de nitrato superiores a 5 μM , possivelmente devido a eventos antrópicos e efluentes frequentes na região trazidas pela corrente de maré, principalmente pelo rio Una. Teores de nitrato acima de 5 mg/L podem ser indicativos de contaminação por atividades antrópicas, onde a presença de nitrito na água subterrânea é um indicativo de poluição recente (BENFEITA, 2017). A estação 1 geograficamente mais protegida e afastada da trilha principal do manguezal, apresenta maior densidade de árvores e plântulas de mangue, sugerindo um local menos perturbado. A estação 4 apresentou os valores mais elevados de nitrato, amônio e nitrito, possivelmente associados aos efluentes da Vila de Pescadores e à proximidade do riacho da Rasa. Além dos resultados para nutrientes, a salinidade das estações de coleta 1 e 4 demonstraram maiores divergências. A oxidação de amônia, que é a primeira etapa da nitrificação conduzida pelas bactérias oxidantes de amônia, apresenta respostas variadas à salinidade em (10–20 ppt) em diferentes ambientes (WANG *et al.*, 2018). O aumento da salinidade pode impactar diretamente a nitrificação, limitando a atividade dos organismos nitrificantes e aumentando o efluxo de amônia, o que intensifica a nitrificação (DITTMANN *et al.*, 2022).

HALDAR *et al.* (2018) relatam que sedimentos de manguezais fortemente influenciado por esgoto bruto e atividades antrópicas têm menor diversidade e riqueza taxonômica microbiana em comparação com de menos intervenções humanas. Assim, a avaliação e a comparação da diversidade microbiana e das condições circundantes no Mangue de Pedra se fazem necessárias para analisar esta relação às mudanças ambientais de longo prazo.

Além dos nutrientes, outros parâmetros ambientais como a temperatura podem modificar o ambiente na rizosfera aumentando a retenção de produtos orgânicos, produção de enzimas e nutrientes (KUZUYAKOV *et al.*, 2019). A temperatura estimula atividades microbianas e a permeabilidade da membrana das células radiculares, acelerando a exsudação e ampliando a rizosfera para atividades enzimáticas (RAZAVI *et al.*, 2019). A temperatura média de 26 °C, encontrada neste estudo, não se apresentou extrema o suficiente para alterar significativamente a composição microbiana, permitindo que as raízes continuem estruturando os parâmetros bióticos, químicos e o ambiente físico.

Para compreensão da formação de microbiomas associados às plantas do Mangue de Pedra, analisamos os compartimentos vegetais, rizosfera e raiz para

caracterização bacteriana. Em todos os vegetais das estações de coleta, nossos resultados mostraram a dominância do Filo Firmicutes, representado pelas espécies *Bacillus halotolerans*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus casseliflavus*, *Bacillus sp*, *Exiguobacterium profundum*, *Pseudogracilibacillus marinus* e *Bacillus cereus*. Em menor distribuição, foi observado no Filo Proteobacteria representado por Gammaproteobacteria pelas espécies: *Alcanivorax hongdengensis*, *Thioalkalivibrio sulfidiphilus*, *Vibrio variabilis* e *Thiohalocapsa marina*.

Na América do Sul várias pesquisas relatam Firmicutes como o Filo mais dominante principalmente pela família Bacillaceae (FERNÁNDEZ-CADENA *et al.*, 2020; ISAZA *et al.*, 2021, SANTANA *et al.*, 2021). A proporção de Proteobacteria é relatada em manguezais como o segundo Filo mais dominante, com diferenças mínimas em porcentagem para Firmicutes (LAI *et al.*, 2022).

A prevalência por Firmicutes e Proteobacteria tanto na raiz como na rizosfera sugere uma força seletiva dos vegetais sobre as comunidades microbianas no Manguê de Pedra. As condições ambientais e da geomorfologia podem diferir a composição das comunidades microbianas de acordo com o tipo de vegetal (CHUNHUA *et al.*, 2023; TRIVEDI *et al.*, 2020; LAI *et al.*, 2022). O microbioma associado às plantas são estruturadas por regras gerais e interações complexas entre microrganismos, plantas hospedeiras e o ambiente, apesar dos mecanismos subjacentes não serem totalmente compreendidos (TRIVEDI *et al.*, 2020).

No compartimento raiz dos vegetais do Manguê de Pedra, observamos em todas as estações de coleta a distribuição das bactérias *Proteobacteria*, *Desulfovibrionales*, *Pseudomonata*, *Actinomycetota*, e de maior distribuição para *Bacilli*. Esta distribuição e organização microbiana sugere uma seleção para o ambiente endofítico de especificidade e função microbiana.

Os grupos bacterianos comuns dos manguezais são rizobactérias fixadoras de nitrogênio representados por *Proteobactérias*; solubilizadoras de fosfato por *Bacillus*, *Vibrionacea*, *Pseudomonata*, e redutoras de sulfato representados por *Desulfovibrio* (HOLGUIN *et al.*, 2001; THATOI *et al.*, 2013; LAI *et al.*, 2022). O gênero *Bacillus* é comumente encontrado em solo, águas residuais e sedimentos de mangue, nos quais também são encontrados gêneros bacterianos halotolerantes que desempenham papéis importantes na interação planta-microrganismo, como a fixação de nitrogênio, promoção do crescimento da planta e proteção contra patógenos (ALMEIDA *et al.* 2021; SHAHRAJABIAN, 2023). A família Bacillaceae apresenta potencial metabólicos

das vias dos carboidratos (ciclo do citrato e pentoses fosfato), bem como das vias do metabolismo do enxofre e nitrogênio, sugerindo que suas abundâncias são ocupadas por essas famílias nas zonas de maré (DE SANTANA *et al.*, 2021; SPEALMAN *et al.*, 2020; LAI *et al.*, 2022). A literatura frequentemente relata a dominância de Firmicutes e a baixa abundância de outras espécies na diversidade microbiana, especialmente na zona entremarés, onde *Bacilli* é predominantemente representado (ISAZA *et al.*, 2021; FERNÁNDEZ-CADENA *et al.*, 2020; DE SANTANA *et al.* 2021; CECCON *et al.*, 2019; LAI *et al.*, 2022).

Nas estações de coleta 1 e 4, apesar das diferenças nos valores de nutrientes, o grupo *Bacilli* também predominou, sugerindo uma possível seletividade pelo vegetal *Avicennia schaueriana*. A dominância de *Bacilli* encontrado tanto na rizosfera e na raiz dos vegetais no Mangue de Pedra, sugere uma amplificação e seleção heterogênea associadas na montagem das comunidades microbianas. Esta montagem possivelmente está associada as funções microbianas específicas, ocorrendo assim o controle no rizoplano da entrada de microrganismos na raiz e da diversidade microbiana controlada por exsudados radiculares (TRIVEDI *et al.* 2020; ZHUANG *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2016). Os exsudados de raízes em manguezais como aminoácidos, ácidos orgânicos, poli-hidroxiácidos, açúcares, fosfatos, ácidos fenólicos (ácido ftálico, ácido salicílico) e ácidos graxos (ácido palmítico, ácido mirístico e ácido oleico) em grandes quantidades poderiam atrair mais probióticos que protegem as plantas hospedeiras (BAIS *et al.*, 2006; ZHUANG *et al.*, 2020).

Diferentes padrões de comunidades bacterianas e fúngicas podem ocorrer devido à diferenciação de nicho ao longo dos compartimentos radiculares e aos efeitos de exsudação das raízes de mangue (LUO *et al.*, 2018; SAKHIA *et al.*, 2016; ZHUANG *et al.*, 2020). Nossos resultados para FMA, foram observados glomeroesporos pela técnica morfo-taxonômica, pertencentes ao Filo Glomeromycota em todos os sedimentos rizosférico dos vegetais analisados, sendo de maior ocorrência para Glomeraceae (3/4 estações de coletas), seguido por Acaulosporaceae. A ocorrência de glomeroesporos no Mangue de Pedra, nos sedimentos de *A. schaueriana*, também observada por Bomfim (2019) utilizando a técnica morfo-taxonômica o que corrobora com os nossos resultados.

Apesar do potencial dos estudos morfo-taxonômicos de FMA para fornecer estimativas quantitativas, a precisão na identificação pode ser subestimada devido às

semelhanças morfológicas entre espécies e pela presença de esporos inviáveis (KRUGER *et al.*, 2011; COFRÉ *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2022).

No resultado molecular para FMAs no Mangue de Pedra, identificamos espécies encontradas também pela técnica morfo-taxônômica. A presença das espécies *Paraglomus occultum* e *Funneliformis mosseae*, identificado em ambas metodologias, apresentaram distribuição distinta das estações de coleta. Este cenário foi favorável pois possibilitou maior cobertura da distribuição geográfica para FMAs, evitando também possíveis equívocos de identificação. Neste contexto, a combinação de estudos moleculares e morfológicas tem sido apontada como a metodologia mais adequada para classificar os FMA e descrever sua distribuição geográfica (COFRÉ *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2022; LEE *et al.*, 2008).

Nas estações de coleta 1 e 4, a identificação de FMA do gênero *Acaulospora* em *A. schauerianna* evidenciou sua ampla distribuição na região e capacidade de adaptação a diversas condições ambientais. Apesar da presença de *Acaulospora* na mesma espécie de mangue, o biotipo das plantas hospedeira parece exercer uma pressão da seleção da estrutura das comunidades fúngicas endofíticas na rizosfera (LEE *et al.*, 2020; ZENG *et al.*, 2024). As mudanças na composição da comunidade de FMAs pode estar associado a diferentes ambientes, principalmente relacionados à vegetação e ao solo, afetando significativamente as comunidades de FMAs (DA SILVA *et al.*, 2017).

Na estação de coleta 3, não foi identificado pela técnica molecular, colonização endofítica por FMA do único e recente espécime de *Rhizophora mangle*. Foi observado somente em sedimento rizosférico na presença de *Scutellospora calospora*. Pela técnica morfo-taxônômica, foram observados glomerosporos em sedimento rizosférico, corroborando com a técnica molecular. Apesar de não identificarmos FMA na raiz da *Rhizophora mangle*, não é possível afirmar que não haja colonização endofítica, uma vez que foi realizada apenas uma única coleta. A identificação de FMA observada somente no sedimento rizosférico, possivelmente possa ocorrer pelo carreamento dos glomerosporos provenientes da variação de maré ou da vegetação costeira. Formas de dispersão por águas fluvio-marinhas, animais e vegetação costeira são relatadas como meios de transporte de FMA (SCHMIDT *et al.*, 1986; DA SILVA *et al.*, 2017). Todavia, se faz necessário o monitoramento na *R. mangle* para elucidar melhor esse resultado.

Outro fator relevante foi a baixa demanda de fosfato no vegetal *R. mangle*, comparado aos demais vegetais analisados no Mangue de Pedra. Os vegetais micorrizados absorvem fósforo solubilizado proveniente das hifas estendendo a zona de depleção (KOTHAMASI *et al.*, 2006, SEHOANE *et al.*, 2023). Porém, a demanda de fósforo (P) pode influenciar fortemente na arquitetura radicular e na composição da comunidade de FMA (BEVER, 2001; MALICKA *et al.*, 2022). A colonização radicular por FMA, frequentemente, é relacionada a solos deficientes de P, embora a esporulação dos esporos possa ser influenciada positivamente pelo incremento de P, em outros, a influência é negativa (EZETA e SANTOS, 1980; NEUMANN e GEORGE, 2004; SUBRAMANIAN, *et al.*, 2006; MOREIRA, *et al.*, 2012). A disponibilidade de fósforo no solo pode afetar a eficiência de algumas espécies de FMA, influenciando na colonização das raízes, composição e distribuição das espécies de fungos no ambiente (PICONE, 2000).

A repressão da resposta imune mediada pela privação de fosfato, permite um acúmulo de associações mutualísticas planta-fúngico que aumenta a absorção de fosfato inorgânico pela planta (HACQUARD *et al.*, 2016; TRIVEDI *et al.*, 2020). Algumas plantas como as rhizophoraceae podem apresentar aumento de compostos fenólicos nas células corticais, formando uma barreira física contra a colonização intracelular por FMA (RASHIDI *et al.*, 2022). Entretanto, KOTHAMASI *et al.* (2006), observaram que o solo da rizosfera dos mangues de *Rhizophora mucronata Lamk.*, *Rhizophora stylosa Griff.*, *Bruguiera gymnorrhiza (L.)* em South Bay, Great Nicobar, Índia, apresentava baixos níveis de fosfato inorgânico ($0,86 \pm 0,42$ mg), sendo encontrados FMAs do gênero *Glomus* e bactérias solubilizadoras de fosfato que estariam a mobilizar fosfato da rizosfera para esses vegetais.

Na raiz da *R. mangle* do Mangue de Pedra, foi observada pela técnica molecular a presença de *Bacillus sp.* Esta cepa é conhecida por sua capacidade de solubilizar fosfato em formas não disponíveis em ambientes de mangue com nutrientes limitados, além de promover o crescimento das plantas e a tolerância à salinidade. (GOBINDA *et al.*, 2024; DE SANTANA *et al.*, 2021; SPEALMAN *et al.*, 2020; LAI *et al.*, 2022).

Na rizosfera da *R. mangle* do Mangue de Pedra, foi observada a bactéria *Thioalkalivibrio sulfidophilus* que possivelmente possa atuar na oxi-redução na rizosfera. Este gênero é relatado como uma bactéria oxidantes de enxofre haloalcalifílicas e quimioautotróficas obrigatória, que oxida sulfeto de hidrogênio (H₂S)

como doador de elétrons, tolera pH na faixa de 9,5 a 11, e altas concentrações de sódio (AHN AC, *et al.*, 2017). A rizosfera de *R. mangle*, é relatada como sulfídrica, apresentando composto de enxofre reduzido (FRUEHAUF, 2005; ANDRADE & PATCHINEELAM, 2000). O gênero Thioalkalivibrio isoladas de diferentes sedimentos, apresenta uma diversidade genética sugerida como uma espécie genômica que abriga cepas geograficamente separadas umas das outras, ou que são encontradas apenas em uma área específica ou endêmica (MORRONE, 1995; FOTI *et al.*, 2006; AHN AC, *et al.*, 2017, MUYZER *et al.*, 2011, BECARELI *et al.*, 2020).

6.1. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

A presença dos FMAs Acaulosporaceae e Glomeraceae encontrados no Mangue de Pedra tem sido relatada em ambientes hipersalinos, ampla gama de pH, como também em solos contaminados com níquel, cádmio e arsênico, indicando seu potencial biotecnológico para atividades de biorremediação em ambientes poluídos (DA SILVA *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2022; SCHNEIDER *et al.*, 2013; YANO-MELO *et al.*, 2003, HARMANJIT *et al.*, 2023; LEE *et al.*, 2020; MALICKA *et al.*, 2022). Apesar de não termos medido metais pesados no presente estudo, a presença desses FMAs pode estar contribuindo na mitigação de contaminantes no Mangue de Pedra que nos últimos anos tem sido exposto a poluentes.

O FMA *Funneliformis mosseae*, observado na gramínea *Spartina sp.* são citados pela melhora do estado nutricional das plantas mitigando o estresse oxidativo, aumentando a tolerância à presença de contaminantes de hidrocarbonetos (DA SILVA *et al.*, 2022; LENOIR *et al.*, 2016; MALICKA *et al.*, 2021; MALICKA *et al.*, 2022; MARRO *et al.*, 2022). Apesar da plasticidade à exposição de hidrocarbonetos dos FMAs, a diminuição de sua riqueza pode favorecer a dominância de *Funneliformis*, cujas características funcionais estimulam as atividades de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos (MALICKA *et al.*, 2022).

Bactérias podem formar estruturas semelhantes a biofilme na superfície das hifas dos FMAs (MIQUEL GUENNOG *et al.*, 2018; TAKTEK *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2020). Em nossos resultados, a bactéria *Alcanivorax hongdengensis* identificada na rizosfera da *Spartina sp.*, possui genes envolvidos na degradação de alcanos em diferentes substratos marinhos poluídos por óleo (WANG *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2009; CAO *et al.*, 2022). Das bactérias hidrocarbonoclasticas obrigatórias, a *Alcanivorax*

também tem recebido atenção pela capacidade da biodegradação de plásticos à base de petróleo, como polietileno de baixa densidade como tereftalato e polipropileno, recebendo atenção na plastisfera, um novo ecossistema que hospeda comunidades microbianas na superfície dos plásticos (CAO *et al.*, 2022).

O gênero *Thioalkalivibro*, observado na *R. mangle* é um gênero de interesse industrial com aplicações nos processos de oxidação de H₂S produzido como resíduo em diversos processos industriais como curtimento de couro, fabricação de papel, produção de energia por refino de petróleo, biogás e fontes geotérmicas (BECARELI *et al.*, 2020)

A espécie *Exiguobacterium profundum* é relatada pelo seu potencial biotecnológico de remediação por sequestrar urânio de sedimento marinho contaminado no Sul da Índia (MANOBALA *et al.* 2019). As cepas de *Exiguobacterium* podem produzir uma variedade de enzimas que as ajudam a manter sua estabilidade em uma ampla faixa de temperatura, como protease alcalina, guanosina quinase, EKTA catalase, ATPases, desidrogenase e esterase, podendo ser encontrados em diversos ambientes (OZDEMIR *et al.*, 2021).

Várias cepas bacterianas têm sido reconhecidas por sua capacidade de quebrar hidrocarbonetos aromáticos encontrados em manguezais. Essas cepas englobam *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Marinobacter*, *Thalassolituus* e *Alcanivorax* (ALMEIDA *et al.*, 2021; ANU *et al.*, 2024)

A classe *Bacilli* encontrados em todas as estações de coleta do Mangue de Pedra, têm sido relatadas como potencial biorremediador em degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em sedimentos contaminados com óleo diesel através da formação de biofilmes nas raízes das plantas de mangue facilitando o processo de biorremediação de áreas contaminadas (SAMPAIO *et al.*, 2019; ABDUL *et al.*, ALMEIDA *et al.*, 2021; ANU *et al.*, 2024).

Bacillus extraídos de manguezais também tem sido descrito como potencial biocontrole na agricultura pela produção de várias enzimas líticas extracelulares, incluindo celulasas, amilases, proteinases e quitinases, que podem ser usadas para múltiplas aplicações biotecnológicas (OLIVEIRA *et al.*, 2023; SILVA *et al.*, 2023)

7. CONCLUSÃO

A pesquisa realizada no Mangue de Pedra, representa um marco significativo na compreensão dos microrganismos autóctones com potencial biotecnológico associados a rizosfera e raiz dos vegetais de mangue. A identificação desses microrganismos pelas técnicas morfo-taxonômicas e molecular trazem uma abordagem ecológica, assim como uma perspectiva de explorar o potencial biotecnológico para o uso da biorremediação e fitorremediação futuras, contribuindo na preservação e conservação desse raro manguezal diante de um eventual cenário de contaminação por efluentes e derivados de hidrocarbonetos de petróleo.

O Mangue de Pedra, apresenta condições de geomorfologia específica e rara para um manguezal. Além dessas peculiaridades este manguezal é constantemente exposto a ações antrópicas como derramamento de efluentes e derivados de hidrocarbonetos. A rizosfera deste manguezal fornece um potencial de recurso de microrganismos que podem ser usados como inóculo ou posteriormente desenvolvidos como um consórcio microbiano. Nessa perspectiva, confirmamos a hipótese que o Mangue de Pedra da região de Armação dos Búzios, possui uma grande diversidade microbiana, incluindo as variedades de FMAs e bactérias no sedimento rizosférico e nas raízes dos mangues de potencial biotecnológico.

As metodologias aqui utilizadas, permitiram a identificação precisa de espécies de fungos micorrízicos arbusculares e espécies bacterianas, revelando uma diversidade considerável nos diferentes pontos de coleta. Especificamente, espécies como *Paraglomus occultum*, *Acaulospora spinosa*, *Funneliformis mosseae*, *Scutellospora calospora*, e *Acaulospora cavernata*, além de gêneros bacterianos como *Bacillus sp*, *Denitrovibrio sp* e *Alcanivorax sp*, destacaram-se pela sua presença e potencial biorremediador.

A análise comparativa da diversidade de FMAs e bactérias nos diferentes pontos de coleta demonstrou uma maior prevalência para Glomeraceae e Bacilli, respectivamente. Isso sugere que esses microrganismos desempenham um papel crucial nas interações ecológicas e na capacidade de adaptação do ecossistema do mangue às condições ambientais e às pressões antropogênicas. Nesta perspectiva,

uma abordagem holística que compreenda uma simbiose tripartida entre plantas, FMAs e bactérias devem ser consideradas em investigações futuras para compreender as mudanças na diversidade funcional e estrutural desses microrganismos e seus potenciais biotecnológicos.

Além disso, a caracterização dos parâmetros físico-químicos e nutrientes nos pontos de coleta, embora com dados incipientes, forneceu uma visão abrangente das condições ambientais do Mangue de Pedra, contribuindo para a compreensão da sua ecologia única e das interações microbianas. Comparando os resultados com outros manguezais pode-se verificar a presença de organismos semelhantes, reforçando a importância de estudos específicos para esses ecossistemas. No entanto, destaca-se a vulnerabilidade dos manguezais de pedra devido à sua raridade e sensibilidade às mudanças ambientais e às atividades humanas.

Este estudo pioneiro no Mangue de Pedra não só proporciona uma compreensão inicial das interações ecológicas, como também estabelece uma base sólida para o uso de consórcios microbianos na fitorremediação futura. Ao promover a preservação deste ecossistema raro, esta pesquisa contribui significativamente para a ciência ambiental e para a implementação de práticas sustentáveis de manejo e conservação de manguezais.

8. PERSPECTIVAS

- O estudo das interações entre esses três componentes pode revelar mecanismos sinérgicos que aumentam a eficiência da fitorremediação.
- Abordagens Metagenômicas: A aplicação de técnicas metagenômicas pode revelar a presença de microrganismos ainda não descritos, proporcionando uma visão mais completa do microbioma do Mangue de Pedra. Esta abordagem pode identificar novos genes e vias metabólicas envolvidas na degradação de poluentes e na estabilização de metais pesados, expandindo o potencial biotecnológico dos microrganismos autóctones.
- Experimentos de Degradação e Estabilização: Coletar sedimentos e plantas de mangue para experimentos controlados em laboratório com diferentes concentrações de hidrocarbonetos de petróleo será fundamental. Testes de sobrevivência e crescimento das plantas, juntamente com a análise da degradação de hidrocarbonetos e estabilização de metais pesados por FMAs

e bactérias, fornecerão dados valiosos sobre a eficácia desses microrganismos em condições de contaminação variada.

- Monitoramento de Fatores Ambientais: O monitoramento de fatores ambientais como fósforo (P), nitrogênio (N), pH, salinidade, tempo de exposição à inundação e temperatura, e sua correlação com a taxa de colonização de FMAs e bactérias nas rizosferas das plantas de mangue, será essencial. Esse monitoramento ajudará a identificar as condições ótimas para a colonização e atividade dos microrganismos biorremediadores, permitindo o desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficaz.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL LATIF KHAN, MUHAMMAD NUMAN, SAQIB BILAL, SAJJAD ASAF, KERRI CRAWFORD, MUHAMMAD IMRAN, AHMED AL-HARRASI, JAMAL NASSER AL-SABAHI, NAJEEB UR REHMAN, AHMED A-RAWAHI, IN-JUNG LEE, Mangrove's rhizospheric engineering with bacterial inoculation improve degradation of diesel contamination, **Journal of Hazardous Materials**, 2022, Volume 423, Part A, 127046, ISSN 0304-3894

AGHILI, S.; GOLZARY, A. Greening the earth, healing the soil: A comprehensive life cycle assessment of phytoremediation for heavy metal contamination. **Environmental Technology & Innovation**, v. 32, p. 103241, nov. 2023.

AHN AC, MEIER-KOLTHOFF JP, OVERMARS L, RICHTER M, WOYKE T, SOROKIN DY, et al. (2017) Diversidade genômica dentro do gênero haloalcalifílico *Thioalkalivibrio*. **PLoS UM** 12(3): e0173517.

AKRAM, H. et al. Mangrove Health: A Review of Functions, Threats, and Challenges Associated with Mangrove Management Practices. **Forests**, v. 14, n. 9, p. 1698, 23 ago. 2023.

ALBUQUERQUE, G. M. et al. Fault mapping and characterization of a coastal aquifer related to a mangrove ecosystem, using electrical resistivity tomography (ERT), ground penetrating radar (GPR) and hydrochemical data: The case of the Mangue de Pedra Aquifer, Armação dos Búzios, Brazil. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 120, p. 104095, dez. 2022.

ALENCAR, T. S. Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) e Dark Septate Endophytes (DSE): identificação em vegetais do manguezal de Gargaú, São Francisco de Itabapoana, RJ (Brasil). Dissertação, Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental—Cabo Frio: **Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense**, 2016.

ALI, M. et al. Bioremediation of PAHs and heavy metals co-contaminated soils: Challenges and enhancement strategies. **Environmental Pollution**, v. 295, p. 118686, fev. 2022.

ALONGI, D. M. Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 76, n. 1, p. 1–13, jan. 2008.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, out. 1990.

ANP/SSM; IBAMA. RELATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO DE INCIDENTE – **FPU P-53** (Vazamento de Óleo com Toque na Costa). , 2020. . Acesso em: 20 jun. 2024

ALMEIDA, F.F.; FREITAS, D.; MOTTERAN, F.; FERNANDES, B.S.; GAVAZZA, S.; Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated mangroves: Understanding the historical and key parameter profiles, **Marine Pollution Bulletin**, Volume 169, 2021, 112553, ISSN0025-326X

ANDRADE, R.C. B., PATCHINEELAM, S. R. Especificação de metais-traço em sedimentos de florestas de manguezais com *Avicennia* e *Rhizophora*. Departamento de Geoquímica Ambiental, Instituto de Química - **Universidade Federal Fluminense** - 24020-007 - Niterói – RJ,(2000).

ANU K.; HENNA PARVEEN K.; SNEHA V K.; BUSHEER P.; JUMANA MUHAMMED.; ANU AUGUSTINE. Mangroves in environmental engineering: Harnessing the multifunctional potential of nature's coastal architects for sustainable ecosystem management, Results in Engineering, 2024, Volume 21, 101765, ISSN 2590-1230

ARAUJO, D.S.D. CABO FRIO REGION 1997. In: Davis et al. (eds.) **Centres of Plant Diversity**. WWF/IUCN, Oxford, p. 373-375.

ASEMANINEJAD, A. et al. New Primers for Discovering Fungal Diversity Using Nuclear Large Ribosomal DNA. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0159043, 8 jul. 2016.

BAIS, HP, WEIR, TL, PERRY, LG, GILROY, S. & VIVANCO, JM. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Anu. **Rev. Plant Biol.** (2006), 57, 233–266

BANDEIRA, I. C. N., et al. Geodiversidade da Ilha do Maranhão (2020) **CPRM**,. Escala 1:80.000—[s.l: s.n.].

BANDOPADHYAY, P. C.; CARTER, A. Chapter 2 Introduction to the geography and geomorphology of the Andaman–Nicobar Islands. **Geological Society, London, Memoirs**, v. 47, n. 1, p. 9–18, 21 fev. 2017.

BARIK, J. et al. Mangrove species distribution and water salinity: an indicator species approach to Sundarban. **Journal of Coastal Conservation**, v. 22, n. 2, p. 361–368, abr. 2018.

BECARELLI, S.; LA CHINA, S.; LAPIDUS, A.; PRIJIBELSKI, A.; POLEV, D.; PETRONI, G.; DI GREGORIO, S. A. New *Thioalkalivibrio* sp. Strain Isolated from Petroleum-Contaminated Brackish Estuary Sediments: A New Candidate for Bio-Based Application for Sulfide Oxidation in Halo-Alkaline Conditions. **Water** **2020**, *12*, 1385.

BENFEITA, J. V. E. Hidroquímica do aquífero do Mangue de Pedra, Armação dos Búzios - RJ. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Geociências, Departamento de Geologia, Rio de Janeiro, **UFRJ / IGEO**, 2017.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere: Plant species, soil type and rhizosphere communities. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, n. 1, p. 1–13, abr. 2009.

BERNHARD, A. E. et al. Loss of diversity of ammonia-oxidizing bacteria correlates with increasing salinity in an estuary system. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1289–1297, set. 2005.

BOMFIM, T. O. Identificação de fungos micorrízicos arbuscular (FMAs) associados aos vegetais do Mangue de Pedra, Armação dos Búzios, RJ, Brasil e uso de veículo aéreo não tripulado (VANT) como ferramenta auxiliar para monitoramento. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental – **Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense- Campos dos Goytacazes**, RJ, 2019.xiv,57 f.: il.color.

BOURGEOIS, C. et al. Sedimentary and elemental dynamics as a function of the elevation profile in a semi-arid mangrove toposequence. **CATENA**, v. 173, p. 289–301, fev. 2019.

BRITO, E. M. S. et al. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 8, p. 752–762, out. 2006.

BRUNDRETT, M. C.; TEDERSOO, L. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, v. 220, n. 4, p. 1108–1115, dez. 2018. CAIRNEY, J. W. G. Evolution of mycorrhiza systems. **Naturwissenschaften**, v. 87, n. 11, p. 467–475, 5 dez. 2000.

CAMARA MUNICIPAL DE ARMAÇÃO DOS BÚZIOS. BOLETIM OFICIAL, Nº 922, DECRETO 1059 de 08 de Novembro de 2018. **Prefeitura da cidade de Armação dos Búzios**. . 2018.

CARDONA, T. Thinking twice about the evolution of photosynthesis. **Open Biology**, v. 9, n. 3, p. 180246, mar. 2019.

CARUGATI, L. et al. Impact of mangrove forests degradation on biodiversity and ecosystem functioning. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 13298, 5 set. 2018.

CARVALHO, D. W. A zona costeira brasileira e o gerenciamento dos danos ambientais

futuros. **Revista Lusíada: Direito e Ambiente**, p. 97- 111, 2011.

CECCON, D. M. et al. Metataxonomic and metagenomic analysis of mangrove microbiomes reveals community patterns driven by salinity and pH gradients in Paranaguá Bay, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 694, p. 133609, dez. 2019.

CHENG, L.; ZHOU, Q.; YU, B. Responses and roles of roots, microbes, and degrading genes in rhizosphere during phytoremediation of petroleum hydrocarbons contaminated soil. **International Journal of Phytoremediation**, v. 21, n. 12, p. 1161–1169, 15 out. 2019.

CHEQUER, L. et al. Response of mangrove propagules to the presence of oil and hydrocarbon degrading bacteria during an experimental oil spill. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 45, n. 4, p. 814–821, 10 set. 2017.

CHOT, E.; REDDY, M. S. Role of Ectomycorrhizal Symbiosis Behind the Host Plants Ameliorated Tolerance Against Heavy Metal Stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 855473, 28 mar. 2022.

CHUNHUA LV, CHUANKUAN WANG, ANDONG CAI, ZHENGHU ZHOU. Global magnitude of rhizosphere effects on soil microbial communities and carbon cycling in natural terrestrial ecosystems, **Science of The Total Environment**, 2023. Volume 856, Part 1 ,158961, ISSN 00489697.

CHRISTIE, P.; LI, X.; CHEN, B. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. **Plant and Soil**, v. 261, n. 1/2, p. 209–217, abr. 2004.

CICCO, R. C. DE. Caracterização geofísica do aquífero mangue dos pedra - Armação de búzios, RJ. [s.l.] **UFRJ**, 2018.

COELHO JÚNIOR, C. Manguezal, desenvolvimento estrutural de cobertura vegetal ao longo de gradientes de inundação - Cananéia, São Paulo, Brasil. Dissertação (Mestrado)—São Paulo, Brazil: **Universidade de São Paulo**, 1998.

COFRÉ, M. N. et al. Biodiversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in South America: A Review. Em: PAGANO, M. C.; LUGO, M. A. (Eds.). *Mycorrhizal Fungi in South America. Fungal Biology*. Cham: **Springer International Publishing**, 2019. p. 49–72.

DA SILVA, K. J. G. et al. Phylogenetic Review of Acaulospora (Diversisporales, Glomeromycota) and the Homoplastic Nature of Its Ornamentations. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 9, p. 892, 23 ago. 2022.

DA SILVA, I. R. et al. Changes in arbuscular mycorrhizal fungal communities along a river delta island in northeastern Brazil, **Acta Oecologica**, Volume 79, 2017, Pages 8-17,ISSN 1146-609X.

DE SANTANA, C. O. et al. Effects of tidal influence on the structure and function of

prokaryotic communities in the sediments of a pristine **Brazilian mangrove**. **Biogeosciences**, v. 18, n. 7, p. 2259–2273, 6 abr. 2021.

DELAVAUX, C. S. et al. Environmental identification of arbuscular mycorrhizal fungi using the LSU rDNA gene region: an expanded database and improved pipeline. **Mycorrhiza**, v. 32, n. 2, p. 145–153, mar. 2022.

DHALARIA, R. et al. Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Potential Agents in Ameliorating Heavy Metal Stress in Plants. **Agronomy**, v. 10, n. 6, p. 815, 9 jun. 2020.

DIAS, F. F.; CASTRO; CAMARGO. Indicadores de Mudanças Climáticas e de Variações do Nível do Mar na Costa do Rio de Janeiro: Aquecimento ou resfriamento. Observatorium: **Revista Eletrônica de Geografia**, v. 1, n. 1, p. 21–32, 2019.

DITTMANN, S. et al. Effects of Extreme Salinity Stress on a Temperate Mangrove Ecosystem. **Frontiers in Forests and Global Change**, v. 5, p. 859283, 24 maio 2022.

ELLISON, J. C. Factors Influencing Mangrove Ecosystems. Em: RASTOGI, R. P.; PHULWARIA, M.; GUPTA, D. K. (Eds.). *Mangroves: Ecology, Biodiversity and Management*. Singapore: **Springer Singapore**, 2021. p. 97–115.

ESTADO DO RIO DE JANEIRO, S. DE E. DO A. Plano Municipal de Conservação e Recuperação da Mata Atlântica de Armação dos Búzios. Rio de Janeiro, 2017. **CDU 631.614(815.3)**

ESPINOZA-ALFARO , ULLRICH S. M. Bacterial N₂-fixation in mangrove ecosystems: insights from a diazotroph-mangrove interaction. **Frontiers in Microbiology**, 2015

EZETA, F. N.; SANTOS, O. M. Benefício da introdução de endomicorriza eficiente na utilização de nutrientes em latossolos do sul da Bahia, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 4, p. 13-17, 1980.

FENG, J. et al. Effects of exotic and native mangrove forests plantation on soil organic carbon, nitrogen, and phosphorus contents and pools in Leizhou, China. **CATENA**, v. 180, p. 1–7, set. 2019.

FERNÁNDEZ-CADENA, J. C. et al. Detection of sentinel bacteria in mangrove sediments contaminated with heavy metals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 150, p. 110701, jan. 2020.

FERROL, N.; LANFRANCO, L. (EDS.). *Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Methods and Protocols*. New York, NY: **Springer US**, 2020. v. 2146

FERROL, N.; TAMAYO, E.; VARGAS, P. The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 22, p. 6253–6265, dez. 2016.

FOTI M, Ma S, Sorokin DY, Rademaker JLW, Kuenen GJ, Muyzer G. Genetic diversity and biogeography of haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria belonging to the genus *Thioalkalivibrio*. **FEMS Microbiol Ecol** 2006; 56:95-101 10.1111/j.1574-

6941.2006. 00068.x

FRANÇA, F. M. et al. Climatic and local stressor interactions threaten tropical forests and coral reefs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 375, n. 1794, p. 20190116, 16 mar. 2020.

FRANCK, S. et al. Taxonomic assignment of arbuscular mycorrhizal fungi in an 18S metagenomic dataset: a case study with saltcedar (*Tamarix aphylla*). *Mycorrhiza*, v. 30, n. 2–3, p. 243–255, march, 2020.

FRIMAN, J. Tripartite Interactions Between *Brassica oleracea*, Soil Microbes and Shoot- And Root Feeding Insects. **Wageningen University** and Research ProQuest Dissertations & Theses, 2021. Print ISBNs 9789463958028.

FRUEHAUF, SANDRA PAVAN. *Rhizophora mangle* (mangue vermelho) em áreas contaminadas de manguezal na Baixada Santista/ Sandra Pavan Fruehauf. - Piracicaba, 2005. 223p. il. Tese doutorado –**Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, 2005. Bbliografia

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 46, n. 2, p. 235–244, jun. 1963.

GETTER, C. D.; BALLOU, T. G.; BRUCE KOONS, C. Effects of dispersed oil on mangroves synthesis of a seven-year study. *Marine Pollution Bulletin*, v. 16, n. 8, p. 318–324, ago. 1985.

GOBINDA DEY, JYOTI PRAKASH MAITY, PRITAM BANERJEE, RAJU KUMAR SHARMA, HASSAN ETESAMI, TAPAN KUMAR BASTIA, PRASANTA RATH, UTTARA SUKUL, HSIEN-BIN HUANG, KUO-WEI HUANG, CHIEN-YEN CHEN. Characterization of halotolerant phosphate-solubilizing rhizospheric bacteria from mangrove (*Avicennia* sp.) with biotechnological potential in agriculture and pollution mitigation, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Volume 55,, 102960, ISSN 1878-8181, 2024.

GÓMEZ-ACATA, E. S. et al. Sediment microbial community structure associated to different ecological types of mangroves in Celestún, a coastal lagoon in the Yucatan Peninsula, Mexico. *PeerJ*, v. 11, p. e14587, 8 fev. 2023.

GONÇALVES, O. Biorremediação de substrato de manguezal Contaminado com petróleo, através da adição de Nutrientes (glicerina bruta e torta de mamona) e Fungos *aspergillus* spp ou *penicillium* spp. Dissertação, Pós-Graduação em Geoquímica do Petróleo e Meio Ambiente—Salvador, BA: **Universidade Federal da Bahia**, 2012.

GOTO, B. T.; COSTA, C. M. C.; MAIA, L. C. *Glomus halonatum* Rose & Trappe (Glomeromycota) in South America: comments on the morphological characteristics of the species. *Acta Botanica Brasilica*, v. 23, n. 4, p. 1167–1170, dez. 2009

GUO, X. et al. A mega-phylogeny of the Annonaceae: taxonomic placement of five enigmatic genera and support for a new tribe, Phoenicantheae. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7323, 4 ago. 2017.

HACQUARD, S. et al. Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. **Nat. Commun.** 7, 1–13 (2016).

HALDAR, S.; NAZARETH, S.W. Taxonomic diversity of bacteria from mangrove sediments of Goa: Metagenomic and functional analysis. 3 **Biotech**, 2018, 8, 436.

HANLEY, M. E.; BOUMA, T. J.; MOSSMAN, H. L. The gathering storm: optimizing management of coastal ecosystems in the face of a climate-driven threat. **Annals of Botany**, v. 125, n. 2, p. 197–212, 3 fev. 2020.

HARMANJIT K., TASHIMA, S. S., PANKAJ K., Reconditioning of plant metabolism by arbuscular mycorrhizal networks in cadmium contaminated soils: Recent perspectives, **Microbiological**, 2023, Research, Volume 268,127293, ISSN 0944-5013.

HARRISON, K. A.; BOL, R.; BARDGETT, R. D. PREFERENCES FOR DIFFERENT NITROGEN FORMS BY COEXISTING PLANT SPECIES AND SOIL MICROBES. **Ecology**, v. 88, n. 4, p. 989–999, abr. 2007.

HELPER, V.; HASSENRÜCK, C. Microbial communities in mangrove sediments. Em: *Dynamic Sedimentary Environments of Mangrove Coasts*. **Elsevier**, 2021. p. 141–175.

HERATH BMMD et al. Arbuscular mycorrhizal fungi as a potential tool for bioremediation of heavy metals in contaminated soil. **World Journal of Advanced Research and Reviews**, v. 10, n. 3, p. 217–228, 30 jun. 2021.

HILMI, N. et al. The Role of Blue Carbon in Climate Change Mitigation and Carbon Stock Conservation. **Frontiers in Climate**, v. 3, p. 710546, 7 set. 2021.

HOLGUIN, G., VAZQUEZ, P. & BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biol Fertil Soils** 33, 265–278 (2001)

HOFFMANN, L.V.; LUCENA, V.S. Para entender micorrizas arbuscular. (Embrapa Algodão.Documentos, 156), 2006. 22p. Título. IV. Série. Micorriza-Arbuscular.

HUERGO, L. F.; RISSI, D. V.; ELIAS, A. S.; GONÇALVES, M. V.; GERNET, M. V.; BARRETO, F.; DAHMER, G. W.; REIS, R. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A.; BAURA, V. A.; BALSANELLI, E.; CRUZ, L. M. Influence of ancient anthropogenic activities on the mangrove soil microbiome. **Science of The Total Environment**, 2018, v. 645, p. 1–9.

HUNTLEY, B. J. The Mangrove Biome. Em: HUNTLEY, B. J. (Ed.). *Ecology of Angola*. Cham: **Springer International Publishing**, 2023. p. 383–391.

ICMBIO. Atlas dos Manguezais do Brasil / Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. , 2018.

IMAM, A. et al. Biological machinery for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation: A review. **Bioresource Technology**, v. 343, p. 126121, jan. 2022.

IMCHEN, M. et al. Comparative mangrove metagenome reveals global prevalence of heavy metals and antibiotic resistome across different ecosystems. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11187, 25 jul. 2018.

INVAM; SCHENK, N.; MORTON, J. The International Collection of (Vesicular) **Arbuscular Mycorrhizal Fungi**. Disponível em: <<https://invam.ku.edu/>>.

ISAZA, J. P. et al. Metatranscriptomic characterization of the bacterial community of a contaminated mangrove from the Caribbean. **Regional Studies in Marine Science**, v. 44, p. 101724, maio 2021.

JENKINS, W. R. B. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant disease reporter**, v. 48, n. 9, p. 692, 1964.

KAFLE, A. et al. Phytoremediation: Mechanisms, plant selection and enhancement by natural and synthetic agents. **Environmental Advances**, v. 8, p. 100203, jul. 2022.

KIRWAN, M. L.; MEGONIGAL, J. P. Tidal wetland stability in the face of human impacts and sea-level rise. **Nature**, v. 504, n. 7478, p. 53–60, 5 dez. 2013.

KOBLÍŽEK, M. Ecology of aerobic anoxygenic phototrophs in aquatic environments. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 6, p. 854–870, nov. 2015.

KOOP-JAKOBSEN, K.; FISCHER, J.; WENZHÖFER, F. Survey of sediment oxygenation in rhizospheres of the saltmarsh grass - *Spartina anglica*. **Science of The Total Environment**, v. 589, p. 191–199, jul. 2017.

KOTHAMASI, D. et al. Arbuscular mycorrhizae and phosphate solubilising bacteria of the rhizosphere of the mangrove ecosystem of Great Nicobar island, India. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, n. 4, p. 358–361, mar. 2006.

KUZYAKOV, Y., BAHAR S. RAZAVI. Rhizosphere size and shape: Temporal dynamics and spatial stationarity, *Soil Biology and Biochemistry*, 2019. Volume 135, Pages 343-360, ISSN 0038-0717

KRISHNAMOORTHY, R. et al. Changes of arbuscular mycorrhizal traits and community structure with respect to soil salinity in a coastal reclamation land. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 72, p. 1–10, maio 2014.

KRISHNAMOORTHY, R. et al. Management of Heavy Metal Polluted Soils: Perspective of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Em: SHAH, S.; VENKATRAMANAN, V.; PRASAD, R. (Eds.). *Sustainable Green Technologies for Environmental Management*. Singapore: **Springer Singapore**, 2019. p. 67–85.

LAI, J. et al. A Systematic Review of the Physicochemical and Microbial Diversity of Well-Preserved, Restored, and Disturbed Mangrove Forests: What Is Known and What Is the Way Forward? **Forests**, v. 13, n. 12, p. 2160, 16 dez. 2022.

LEE, J.; LEE, S.; YOUNG, J. P. W. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi: PCR primers for arbuscular mycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 65, n. 2, p. 339–349, ago. 2008.

LEE, S.-J. et al. Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities of Native Plant Species under High Petroleum Hydrocarbon Contamination Highlights Rhizophagus as a Key Tolerant Genus. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 872, 9 jun. 2020.

LUZ E. de-BASHAN, Juan-Pablo Hernandez, Yoav Bashan. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation– A comprehensive evaluation. **Applied Soil Ecology**, Volume 61, 2012, Pages 171-189, ISSN 0929-1393

LIN, X. et al. Mangrove Sediment Microbiome: Adaptive Microbial Assemblages and Their Routed Biogeochemical Processes in Yunxiao Mangrove National Nature Reserve, China. **Microbial Ecology**, v. 78, n. 1, p. 57–69, jul. 2019.

LIU, X. et al. Revealing structure and assembly for rhizophyte-endophyte diazotrophic community in mangrove ecosystem after introduced *Sonneratia apetala* and *Laguncularia racemosa*. **Science of The Total Environment**, v. 721, p. 137807, jun. 2020.

LOVELOCK, C. E. et al. The vulnerability of Indo-Pacific mangrove forests to sea-level rise. **Nature**, v. 526, n. 7574, p. 559–563, out. 2015.

LU, T. et al. Rhizosphere microorganisms can influence the timing of plant flowering. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 231, dez. 2018.

LU, Z.; IMLAY, J. A. When anaerobes encounter oxygen: mechanisms of oxygen toxicity, tolerance and defence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 12, p. 774–785, dez. 2021.

LUNDBERG, D. S. et al. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 86–90, ago. 2012.

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, ago. 2018.

MACHADO, W.; LACERDA, L. D., et al. Overview of the Biogeochemical Controls and Concerns with Trace Metal Accumulation in Mangrove Sediments. *Environmental Geochemistry in Tropical and Subtropical Environments*. Berlin, Heidelberg: **Springer Berlin Heidelberg**, 2004. p. 319–334.

MAI, Z. et al. Characteristics of Microbial Community and Function With the Succession of Mangroves. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 764974, 7 dez. 2021.

MALICKA, M.; MAGURNO, POSTA K.; Chmura.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Differences in the effects of single and mixed species of AMF on the growth and oxidative stress defense in *Lolium perenne* exposed to hydrocarbons, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 217, 2021, 112252, ISSN 0147-6513

MALICKA, M.; MAGURNO, F.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Phenol and Polyaromatic Hydrocarbons Are Stronger Drivers Than Host Plant Species in Shaping the Arbuscular Mycorrhizal Fungal Component of the Mycorrhizosphere. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, p. 12585, 20 out. 2022.

MANSUR, K.; GUEDES, E.; ALVES, M. DA G. Geoparque Costões e Lagunas do Estado do Rio de Janeiro (RJ): proposta. [s.l.] **CPRM**, 2012.

MANSUR, K. L. Diretrizes para a Geoconservação do Patrimônio Geológico do Estado do Rio de Janeiro: o caso do Domínio Tectônico de Cabo Frio. Tese, Programa de Pós-graduação em Geologia, Instituto de Geociências—Rio de Janeiro: **UFRJ**, 2010.

MARCOS, M. S. et al. Tide as Steering Factor in Structuring Archaeal and Bacterial Ammonia-Oxidizing Communities in Mangrove Forest Soils Dominated by *Avicennia germinans* and *Rhizophora mangle*. **Microbial Ecology**, 2018.V 75, n. 4, p. 997–1008,.

MARRO, N.; GRILLI, G.; SOTERAS, F.; CACCIA, M.; LONGO, S.; COFRÉ, N.; BORDA, V.; BURNI, M.; JANOUŠKOVÁ, M.; URCELAY, C. The effects of arbuscular mycorrhizal fungal species and taxonomic groups on stressed and unstressed plants: a global meta-analysis. **New Phytologist**, v. 235, n. 1, p. 320–332, 2022.

MCNEAR JR., D. H. The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. **Nature Education Knowledge**, 2013

MEDRI, M. E. (ED.). A bacia do rio Tibagi. **Londrina, Paraná: s.n.**, 2002.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 634–663, set. 2013.

MISLAN, M.; GATES, I. D. Release of sugars and fatty acids from heavy oil biodegradation by common hydrolytic enzymes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 15584, 30 out. 2019.

MOHRIAK, W. U.; BARROS, A. Z. Novas evidências de tectonismo cenozóico na região sudeste do Brasil: o graben de Barra de São João na plataforma continental de Cabo Frio, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 20, n. 1–4, p. 187–196, 1990.

MOITY, N.; DELGADO, B.; SALINAS-DE-LEÓN, P. Mangroves in the Galapagos islands: Distribution and dynamics. **PLOS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0209313, 9 jan. 2019.

MORADI, B. et al. Physiological responses and phytoremediation capability of *Avicennia marina* to oil contamination. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 43, n. 2, p. 18, fev. 2021.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do solo. 2. ed. atual. e ampl. Lavras, MG: **UFLA**, 2006. 729p.

MOREIRA, M. et al. Phosphorus doses determine the prevalence of native arbuscular mycorrhizal fungi in *Araucaria angustifolia*. **Ciência Florestal, Santa Maria**, v. 22, n. 4, p. 813-820, out. -dez., 2012, ISSN 0103-9954.

MORRONE JJ, CRISCI JV. Historical Biogeography: Introduction to Methods. *Annu Rev Ecol Systemat.* 1995; 26: 373–401.

MOURA, D.O.; LAMPARELLI, C.C.; RODRIGUES, F.O.; et al. Decomposição de folhas em manguezais na região de Bertioga, São Paulo, Brasil. In: SIMPÓSIO DE ECOSSITEMAS BRASILEIRO, 4., Águas de Lindóia, 1998. **Anais**. Águas de Lindóia: ACIES, 198. p.130-154.

MIQUEL GUENNOC, C., ROSE, C., LABBÉ, J., & DEVEAU, A. (2018). Bacterial biofilm formation on the hyphae of ectomycorrhizal fungi: a widespread ability under controls? *FEMS Microbiology Ecology*, 94(7)

MUYZER G, SOROKIN DY, MAVROMATIS K, LAPIDUS A, CLUM A, IVANOVA N, PATI A, D'HAESELEER P, WOYKE T, KYRPIDES NC. Complete genome sequence of "Thioalkalivibrio sulfidophilus" HL-EbGr7. **Stand Genomic Sci.** 2011, Feb 14;4(1):23-35.

NATHAN, V. K.; VIJAYAN, J.; AMMINI, P. Comparison of bacterial diversity from two mangrove ecosystems from India through metagenomic sequencing. **Regional Studies in Marine Science**, v. 35, p. 101184, mar. 2020.

NGUYEN, H. T. M. et al. Seasonal variability of faecal indicator bacteria numbers and die-off rates in the Red River basin, North Viet Nam. **Scientific Reports**, v. 6, p. 21644, 12 fev. 2016.

NEUMANN, E.; GEORGE, E. Colonisation with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) enhanced phosphorus uptake from dry soil in *Sorghum bicolor* (L.). **Plant and Soil**, v. 261, p. 245-255, 2004.

OBRACZKA, M.; MANSUR, K. L.; DA SILVA, G. C. Towards Sustainability and Protection of Threatened Coastal Ecosystems: Management Strategies for a Rare Stone Mangrove in Gorda Beach, Armação dos Búzios, Brazil. Em: MAKOWSKI, C.; FINKL, C. W. (Eds.). *Threats to Mangrove Forests*. Coastal Research Library. Cham: **Springer International Publishing**, 2018. v. 25p. 377–400.

OCHIAI, O. et al. Satellite-based map of global mangrove extent and changes: Global Mangrove Watch (GMW). March, 2022. **IGES**-Institute for Global Environmental Strategies

OEHL, F. et al. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. **IMA Fungus**, v. 2, n. 2, p. 191–199, dez. 2011.

OHNO, Y. et al. Coastal ecological impacts from pumice rafts. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 11187, 19 jul. 2022.

OLIVEIRA, A. E. S. Caracterização do Mangue da Praia Gorda, Armação dos Búzios,

Estado do Rio de Janeiro - RJ. **Rev. Cient. Cent. Univ. Barra Mansa - UBM**, Barra Mansa, v. 9, n. 17, p. 51–56, 2007.

OLIVEIRA, É.J.M.C.; AMORIM, É.A.D.F.; ARAGÃO, F.M.M.; SILVA, W.D.S.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, C.D.D.S.; OLIVEIRA, L.R.L.; GOMES, W.C.; OLIVEIRA, A.S.D.S.; SOUZA, J.C.D.S.; Biocontrol Potential of *Serratia Marcescens* (B8) and *Bacillus* sp. (B13) Isolated from Urban Mangroves in Raposa, Brazil. **Life** **2023**, 13, 2036

ÖPIK, M. et al. Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, v. 23, n. 5, p. 411–430, jul. 2013.

OSBORNE, P. L. Tropical ecosystems and ecological concepts. 2nd ed ed. Cambridge: **Cambridge university** press, 2012.

PARK, C. et al. Comparison of 16S rRNA Gene Based Microbial Profiling Using Five Next-Generation Sequencers and Various Primers. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 715500, 14 out. 2021.

PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 763–775, out. 2008.

PEREIRA, A. R. Espécies de plantas nativas brasileiras com potencial de fitorremediação de metais: uma revisão de literatura, 2022. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia Ambiental

PICONE, C. Diversity and abundance of arbuscular mycorrhizal fungus spores in tropical forest and pasture. **Biotropica**, v. 32, p. 734-750, 2000.

POLIDORO, B. A. et al. The Loss of Species: Mangrove Extinction Risk and Geographic Areas of Global Concern. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10095, 8 abr. 2010.

PRAKASH, M. et al. Coastal Agriculture and Climate Change. 1. ed. London: **CRC Press**, 2021.

PRAUSE, M.; SCHULZ, H. -J; WAGLER, D. Rechnergestützte Führung von Fermentationsprozessen, Teil 2. **Acta Biotechnologica**, v. 4, n. 2, p. 143–151, jan. 1984.

QIAN, L. et al. Vertically stratified methane, nitrogen and sulphur cycling and coupling mechanisms in mangrove sediment microbiomes. **Microbiome**, v. 11, n. 1, p. 71, 5 abr. 2023.

QIU, L. et al. Glomalin-related soil protein (GRSP) in metal sequestration at Pb/Zn-contaminated sites. **Journal of Soils and Sediments**, v. 22, n. 2, p. 577–593, fev. 2022.

RABELO, T. O. Delimitação das unidades geoambientais da geodiversidade do setor

costeiro sudeste da ilha do Maranhão, MA- BRASIL, 2020, **REGNE** v. 6 ISSN:2447-3359

RASHIDI, S.; YOUSEFI, A. R.; POURYOUSEF, M.; GOICOECHEA, N. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the accumulation of secondary metabolites in roots and reproductive organs of *Solanum nigrum*, *Digitaria sanguinalis* and *Ipomoea purpurea*. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 23, 2022.

REEF, R.; FELLER, I. C.; LOVELOCK, C. E. Nutrition of mangroves. **Tree Physiology**, v. 30, n. 9, p. 1148–1160, 1 set. 2010.

REBELO, Vivian de Avelar. Caracterização Hidrogeológica e Hidrogeoquímica da região do Mangue de Pedra (Armação dos Búzios, RJ). Rio de Janeiro. **UFRJ / IGEO**, 2013.

REJINIEMON, T. S. et al. Biodegradation of naphthalene by biocatalysts isolated from the contaminated environment under optimal conditions. **Chemosphere**, v. 305, p. 135274, out. 2022.

RITCHIE, W. et al. Mangroves, Geomorphology. Em: SCHWARTZ, M. L. (Ed.). *Encyclopedia of Coastal Science*. Dordrecht: **Springer Netherlands**, 2005. p. 611–613.

SAFE'I, R. et al. Analysis of Damage to Trees in the Coastal Mangrove Forest of East Lampung Regency. **International Journal of Sustainable Development and Planning**, v. 17, n. 1, p. 307–312, 28 fev. 2022.

SAFWAN AZMAN, MOHD. et al. Total ecosystem blue carbon stocks and sequestration potential along a naturally regenerated mangrove forest chronosequence. **Forest Ecology and Management**, v. 527, p. 120611, jan. 2023.

SANTANA, C.; SPEALMAN, P.; MELO, V.; GRESHAM, D.; BOMFIM DE JESUS, T.; CHINALIA, F. Effects of tidal influence on the structure and function of prokaryotic communities in the sediments of a pristine Brazilian mangrove. **Biogeosciences** 2021, 18, 2259–2273.

SAKHIA, N. et al. Study of Bacterial Diversity of Mangroves Rhizosphere. **Open Journal of Marine Science**, v. 06, n. 01, p. 23–31, 2016.

SAMPAIO, C.J.S., de Souza, J.R.B., Damião, A.O. et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a diesel oil-contaminated mangrove by plant growth-promoting rhizobacteria. 3 **Biotech** 9, 155 (2019).

SAMPAIO, C. J. S. et al. Biodegradação do petróleo por células bacterianas imobilizadas em esferas de amido de milho e alginato. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 17, p. e220101724706, 27 dez. 2021.

SANTOS, E. A. R. Delimitação, inventário e avaliação da distribuição das espécies

formadoras do Mangue da Pedra, praia gorda, Armação dos Búzios, RJ. Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal—SEROPÉDICA, RJ: Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, **UFRRJ**, jun. 2016.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; VALE, C.; CINTRÓN, G. Monitoramento do ecossistema manguezal: estrutura e características funcionais. s. In: TURRA, A., and DENADAI, MR., orgs. Protocolos para o monitoramento de habitats bentônicos costeiros – Rede de Monitoramento de Habitat Bentônicos Costeiros – **ReBentos** [online]. São Paulo: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 2015. SciELO Books

SCHMITT, R. S. A origem de Búzios: Um evento Tectono-Metamórfico Cambro-Ordoviciano caracterizado no Domínio Tectônico de Cabo Frio, Faixa Ribeira – Sudeste do Brasil. Tese de Doutorado. **UFRJ**, 2001.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1413–1421, dez. 2001.

SHAHRAJABIAN, M. H. WU, Y.; LAI; SUN, W. The Application of Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Microbial Biostimulant, Sustainable Approaches in Modern Agriculture. *Plants*, [s. l.], v. 12, n. 17, p. 3101, 2023.

SEPÚLVEDA-CORREA, A. et al. Genes associated with antibiotic tolerance and synthesis of antimicrobial compounds in a mangrove with contrasting salinities. **Marine Pollution Bulletin**, v. 171, p. 112740, out. 2021.

SIVARAM, A. K. et al. Rhizodegradation of PAHs differentially altered by C3 and C4 plants. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 16109, 30 set. 2020.

SILVA, M.; SREEJA, S.J.; THARA, S.S.; HEERA, G.; ANITH, K.N. Endophytic *Bacillus spp.* suppress *Rhizoctonia solani* web blight of bush cowpea. **Rhizosphere**, 2023, 25, 100682

SOFFIATI, A. The mangroves of Búzios. **Boletim do Observatório Ambiental**, 2011 Alberto Ribeiro Lamego, Campos dos Goytacazes/RJ.

SPEALMAN, P. et al. Effects of tidal influence on the structure and function of prokaryotic communities in the sediments of a pristine Brazilian mangrove. **Dryad**, 27 jul. 2020.

SCHNEIDER, J.; STÜRMER, S. L.; GUILHERME, L. R. G.; DE SOUZA MOREIRA, F. M.; SOARES, C. R. F. D. S. Arbuscular mycorrhizal fungi in arsenic-contaminated areas in Brazil. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, v. 262, p. 1105–1115.

SRIKANTH, S.; LUM, S. K. Y.; CHEN, Z. Mangrove root: adaptations and ecological importance. **Trees**, v. 30, n. 2, p. 451–465, abr. 2016.

STRICKLAND, J.D.H. AND PARSONS, T.R. (1972) A Practical Handbook of Seawater Analysis. 2nd edition. Ottawa, Canada, **Fisheries Research Board of Canada**, 310pp. Nr. 167 (2nd ed)

SUBRAMANIAN, K. S. et al. Response of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. **Scientia Horticulturae**, v. 107, p. 245-253, 2006.

SUNKUR, R. et al. Mangroves' role in supporting ecosystem-based techniques to reduce disaster risk and adapt to climate change: A review. **Journal of Sea Research**, v. 196, p. 102449, dez. 2023.

SUSILOWATI, R.; SABDONO, A.; WIDOWATI, I. Isolation and Characterization of Bacteria Associated with Brown Algae Sargassum spp. from Panjang Island and their Antibacterial Activities. **Procedia Environmental Sciences**, v. 23, p. 240–246, 2015.

TAMAYO, E. et al. Genome-wide analysis of copper, iron and zinc transporters in the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 14 out. 2014.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 678–687, jul. 1992.

TAMURA, K.; GLEN STECHER, SUDHIR KUMAR, MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, **Molecular Biology and Evolution**, Volume 38, Issue 7, July 2021, Pages 3022–3027

THATOI, H., BEHERA, B.C., MISHRA, R.R. et al. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. **Ann Microbiol** 63, 1–19 (2013)

TAKTEK, S., ST-ARNAUD, M., PICHÉ, Y., FORTIN, J. A., & ANTOUN, H. (2016). Igneous phosphate rock solubilization by biofilm-forming mycorrhizobacteria and hyphobacteria associated with *Rhizoglyphus irregularis* DAOM 197198. *Mycorrhiza*, 27(1), 13–22.

THACHARODI, A. et al. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: An updated microbiological review. **Chemosphere**, v. 328, p. 138498, jul. 2023.

TISSERANT, E. et al. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 50, p. 20117–20122, 10 dez. 2013.

TIWARI, P.; KANG, S.; BAE, H. Plant-endophyte associations: Rich yet under-explored sources of novel bioactive molecules and applications. **Microbiological Research**, v. 266, p. 127241, jan. 2023.

TRIVEDI, P. et al. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 607–621, nov. 2020.

VERGARA, C. et al. Plant-mycorrhizal fungi interaction and response to inoculation with different growth-promoting fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, p. e25140, 2019.

WAHYUNI, E. et al. Detection Of Community Knowledge Level Of Economic, Ecological Benefits And Causes Of Damage To Mangrove Forest Ecosystems. IOP Conference Series: **Earth and Environmental Science**, v. 748, n. 1, p. 012017, 1 abr. 2021.

WANG, H. et al. Salinity is a key factor driving the nitrogen cycling in the mangrove sediment. **Science of The Total Environment**, v. 631–632, p. 1342–1349, ago. 2018.

WANG, Q. et al. Sequestration of heavy metal by glomalin-related soil protein: Implication for water quality improvement in mangrove wetlands. **Water Research**, v. 148, p. 142–152, jan. 2019.

WANGER, A. et al. Media for the Clinical Microbiology Laboratory. Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology. **Elsevier**, 2017. p. 51–60.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697–703, jan. 1991.

WIDADA, J.; NOJIRI, H.; OMORI, T. Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1–2, p. 45–59, 1 out. 2002.

WU, Y.; LAI, Q.; ZHOU, Z.; QIAO, N.; LIU, C.; SHAO, Z. *Alcanivorax hongdengensis* sp. nov., an alkane-degrading bacterium isolated from surface seawater of the straits of Malacca and Singapore, producing a lipopeptide as its biosurfactant. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, 2009, v. 59, n. 6, p. 1474–1479.

WIJAYAWARDENE, NN. et al. Outline of Fungi and fungus-like taxa. Mycosphere Online: **Journal of Fungal Biology**, 11 (1). pp. 1060-1456. ISSN 2077-7019, 2020.

XIMENES, A. C. et al. A comparison of global mangrove maps: Assessing spatial and bioclimatic discrepancies at poleward range limits. **Science of The Total Environment**, v. 860, p. 160380, fev. 2023.

YAN, A. et al. Phytoremediation: A Promising Approach for Revegetation of Heavy Metal-Polluted Land. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 359, 30 abr. 2020.

YANO-MELO, A. M.; SAGGIN, O. J.; COSTA MAIA, L. Tolerance of mycorrhized banana (*Musa* sp. cv. Pacovan) plantlets to saline stress. Agriculture, **Ecosystems & Environment** (2003) v. 95, n. 1, p. 343–348, 2003.

ZENG, K.; JIANHUA GUO, XIAOCHEN HUANG, CHUNTAO HE, JUNJIE GUO, HAO CHEN, YUTAO WANG, GUORONG XIN. Distribution patterns of endophytic fungi in different intertidal plant communities within a tropical mangrove forest in South China, **Rhizosphere**, 2024. Volume 29, 100829, ISSN 2452-2198

ZHANG, Y. et al. The influence of salinity on the abundance, transcriptional activity,

and diversity of AOA and AOB in an estuarine sediment: a microcosm study. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 22, p. 9825–9833, nov. 2015.

ZHANG, Z. et al. Monitoring of 35-Year Mangrove Wetland Change Dynamics and Agents in the Sundarbans Using Temporal Consistency Checking. *Remote Sensing*, v. 15, n. 3, p. 625, 20 jan. 2023.

ZHU, D.-H. et al. Effects of Environmental and Spatial Variables on Bacteria in Zhanjiang Mangrove Sediments. *Current Microbiology*, v. 79, n. 4, p. 97, abr. 2022.

ZHUANG, W. et al. Diversity, function and assembly of mangrove root-associated microbial communities at a continuous fine-scale. *npj Biofilms and Microbiomes*, v. 6, n. 1, p. 52, 12 nov. 2020.


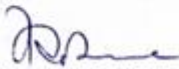

ZULFIQAR, U. et al. Chromium toxicity, speciation, and remediation strategies in soil-plant interface: A critical review. *Frontiers in Plant Science*, v. 13, p. 1081624, 13 jan. 2023.

10. ANEXO

Tabela 7. Resultado das análises microbiológicas e físico-químicas do Manguê de Pedra Búzios/RJ

Estações de coleta	Vegetal	Microrganismos identificados												
		Nutrientes (µM)				Físico-químicos			Taxonomia morfológica		Taxonomia molecular			
		N-NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	°C	%	pH	FMAs		FMAs		Rizobactérias	
							Esporos	Rizosfera	Raiz	Rizosfera	Raiz			
1	<i>Avicennia Schaueriana</i>	2,91	0,07	3,23	0,81	24	23	7	<i>Funneliformes mosseae</i>	<i>Paraglumus occultum</i>	<i>Acaulospora spinosa</i>	<i>Bacillus halotolerans</i>	<i>Arthrobacter agilis</i>	
2	<i>Spartina</i> sp.	9,31	0,38	5,03	0,58	26	23	7	<i>Glomeraceae</i>	<i>Funneliformes mosseae</i>	<i>Funneliformes mosseae</i>	<i>Alcanivorax hongdengensis</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i> + <i>Vibrio variabilis</i>	
3	<i>R. mangle</i>	9,87	0,43	7,98	0,23	25	24	7	<i>Glomeraceae</i>	<i>Scutellospora calospora</i>		<i>Thioalkalivibrio sulfidiphilus</i>	<i>Bacillus</i> sp + <i>Thiohalocapsa marina</i>	
4	<i>Avicennia Schaueriana</i> *	12,81	0,96	12,87	0,54	27	28	7	<i>Paraglumus occultum</i>	<i>Acaulospora cavernata</i>	<i>Acaulospora cavernata</i>	<i>Exiguobacterium profundum</i> + <i>Pseudogracilibacillus marinus</i>	<i>Bacillus cereus</i> + <i>Desulfovibrio giganteus</i>	
MÉDIA		8,72	0,46	7,28	0,54	26	25	7						

10.1 LICENÇA AMBIENTAL

 PREFEITURA DA CIDADE DE ARMAÇÃO DOS BÚZIOS SECRETARIA MUNICIPAL DE AMBIENTE, PESCA E URBANISMO	
AUTORIZAÇÃO AMBIENTAL	
Processo:	9613/2022
Requerente:	Talita Alves Menengat - CPF 107.930.327-84
Endereço:	APA Mangue de Pedras – Armação dos Búzios
Assunto:	Pesquisa sobre fungos Micorrízico Arbusculares (FMAs) na APA Municipal Mangue de Pedras.
Autorização:	Coleta de amostra de raízes para pesquisa sobre fungos Micorrízico Arbusculares (FMAs) na APA Municipal Mangue de Pedras.
Condicionantes Gerais para a pesquisa:	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Esta autorização se restringe à atividade especificada, não se estendendo à nenhuma outra; 2. Comunicar por escrito a esta secretaria o início da pesquisa; 3. O trabalho de pesquisa deverá ser executado por equipe treinada com conhecimento técnico e profissionais devidamente identificados; 4. Esta autorização diz respeito aos aspectos ambientais e não exime o requerente do atendimento das demais licenças previstas para a atividade. Este documento não poderá sofrer qualquer alteração nem ser plastificado, sob pena de perder a validade; 5. Este documento deverá ficar disponível para verificação do serviço de fiscalização; 6. Conforme determinado na lei Municipal Complementar nº 19 de 28 de novembro de 2007: <ul style="list-style-type: none"> • Art. 128. Todo trabalho ou publicação oriundo do material coletado deverá ser enviado à Secretaria Municipal de Ambiente, Pesca e Urbanismo, para que seja incorporado ao acervo de pesquisas municipais. Deverá ser apresentado a SEAPUR uma cópia impressa e outra digital dos relatórios semestrais da atividade de pesquisa e cópia de quaisquer publicações de materiais resultantes desta; 7. A Secretaria de Meio Ambiente não possui responsabilidade técnica pela execução dos trabalhos de pesquisa, sendo a execução de inteira responsabilidade da requerente, podendo responder civil e criminalmente por seus atos; 8. A Secretaria de Meio Ambiente exigirá novas medidas de controle, sempre que julgar necessário; 9. Para a perfuração dos poços, poderá ser feita a limpeza discreta num raio de no máximo 1m no local do furo, sendo selecionados pontos onde a vegetação já se encontra degradada; 10. O estudo deverá ser realizado pelo profissional com vínculo estudantil no Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM – UFF) campus Arraial do Cabo. 11. Atender ao que preconiza a legislação ambiental, em especial o Novo Código Florestal, Lei nº 12.551 de 25 de maio, a lei da Mata Atlântica, Lei 11.428 de 22 de dezembro de 2006, Legislação Estadual, sem prejuízo de outras sanções e penalidades cabíveis; 12. Esta Autorização é válida até 25 de setembro de 2023, 01(um) ano, podendo ser prorrogada por igual período por solicitação do requerente, respeitadas as condições nela estabelecidas. 	
Armação dos Búzios, 25 de setembro de 2022.	
 Roseli de Almeida Pereira Coordenadora de Licenciamento	 Evanildo Carneiro Nascimento Secretário de Ambiente, Pesca e Urbanismo

10.2 ARTIGO SUBMETIDO

Artigo submetido a revista Rhizosphere

Biotechnological Potential of Mangrove Microbiome: Molecular and Morphological Characterization of Bacteria and Arbuscular Mycorrhizal Fungi from Mangue de Pedra in Búzios-RJ- Brazil

Talita Alves Menengat²; Lorena da Graça Pedrosa de Macena¹; Caroline Rezende Guerra¹; Ricardo Coutinho;¹ Marcos Lourenço Brites dos Santos ⁴, Ocimar Ferreira de Andrade ³; Giovanne Redon³, Victor Saraiva³

¹ Marine Biotechnology Department - Institute for Marine Studies Admiral Paulo Moreira, Arraial do Cabo, Brazil.

²Postgraduate Program in Marine Biotechnology, Institute for Marine Studies Admiral Paulo Moreira, Arraial do Cabo, Brazil

³ Federal Fluminense Institute *Campus* Cabo Frio, Brazil

⁴. Division of Ocean and Environmental Chemistry and Geochemistry, Institute for Marine Studies Admiral Paulo Moreira, Arraial do Cabo, Brazil

* Corresponding author at: *E-mail address:* talymenengat@yahoo.com.br. *Telephone:* +5521983715093.

A B S T R A C T

Mangroves are coastal ecosystems found in tropical and subtropical regions. Due to their high productivity, they are crucial for biodiversity. They are associated with mouths of watercourses such as rivers, estuarine deltas, and sea, subject to tidal fluctuations. Mangrove soils are unique, with distinct physicochemical characteristics, rich microbial biodiversity, and biotechnological potential. The region surrounding plant roots (rhizosphere) is a dynamic environment with complex interactions between microorganisms and plants, promoting nutrient recycling, carbon fixation, and resistance to environmental stresses. In the city of Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, there is a rare mangrove of global significance known as Mangue de Pedra,

developed on rocky soil without a river. Freshwater supply is provided by the emergence of rainwater from an underground aquifer that mixes with seawater along a narrow strip of sand and rock at Gorda's Beach. In this rare and understudied scenario, understanding the microbial diversity and biotechnological potential of bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) associated with the rhizosphere is crucial. Identifying these microorganisms is challenging due to morphological variety and intra-specific variation. Molecular tools are essential for understanding this diversity and its biotechnological potential. Therefore, the objective of this study was to evaluate microbial diversity of AMF and bacteria in the rhizospheric sediment and plant roots in Mangue de Pedra, Búzios, Rio de Janeiro, Brazil, aiming to characterise and explore the biotechnological potential of these microorganisms. Water samples from four points in the mangrove were collected for nutrient analysis (nitrite, nitrate, phosphate, and ammonium), and rhizosphere and root samples were collected for morphological and molecular microbiological analyses. For AMF, nucleic acids were extracted and the 18S rRNA gene region was analysed by PCR using universal fungal genes (NS1/NS4) and Glomeromycota-specific genes (AML1/AML2), followed by Sanger sequencing. Additionally, AMF spores found in the rhizosphere were morphotaxonomically identified under a microscope. For bacterial analysis, pure colony isolation was initially performed in Tryptone Soy Broth, followed by DNA extraction. PCR and Sanger sequencing of the 16S rRNA gene region were then conducted. Eleven bacterial genera were identified, belonging to the phyla Actinomycetota, Deferribacteriota, Bacillota, Pseudomonadota, and Proteobacteria. Five AMF species were also identified, including species with biotechnological potential for hydrocarbon and heavy metal bioremediation (*Paraglomus occultum*, *Acaulospora spinosa*, *Funneliformis mosseae*, *Scutellospora calospora*, and *Acaulospora cavernata*). The absence of AMF in the roots of the only recent young specimen of *Rhizophora mangle* in this mangrove suggests a possible lack of mycorrhizal colonisation. This pioneering microbiological research in the region highlights the need for further investigation of microorganisms with biotechnological potential and microbial diversity.

Keywords: Mangue de Pedra, Stone Mangrove, Rhizosphere, Microbiome, Bacteria, Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Bioremediation, Phytoremediation

1. Introduction

Mangroves are coastal ecosystems of significant ecological and economic importance in the fight against global warming, as they sequester and store about 3 to 5 times more carbon than temperate or tropical forests, thus mitigating climate change (LEE, *et al.* 2020; SAFWAN AZMAN *et al.*, 2023). The "Blue Carbon" ecosystem, as mangroves are known, host microbial communities that are active participants in biogeochemical cycles regulating carbon flow through methanogenesis, removing inorganic carbon, and are actively involved in the degradation of various hydrocarbon-derived contaminants, transforming them into water and carbon dioxide, thus providing nutrients for plants and animals (HILMI, 2021; LAI; REJINIEMON, 2022).

Mangrove's substrate is one of the main characteristics shaping these ecosystems, with rocky sediment substrates being rarely described worldwide. In the municipality of Armação dos Búzios, state of Rio de Janeiro, Brazil, there is a mangrove, locally known as Mangue de Pedra, that develops on a sandy-rocky substrate (coarse sand, granules, pebbles, and rock blocks) and in the absence of a river, where freshwater is supplied by a subterranean system from an aquifer (MANSUR, 2010; OBRACZKA, 2018). Due to the scarcity of studies on microbial communities in the Mangue de Pedra, little is known about their ecological dynamics and biological interactions. Therefore, there is a significant need and potential for research in mangrove microbiology concerning ecology, biogeochemistry, and geomorphology for biotechnological purposes (LAI *et al.*, 2022).

Mangrove ecosystems allow the establishment of microbial communities parallel to the coast due to their ability to recycle nutrients in organic matter (MOITY *et al.*, 2019). Associations of microorganisms with the roots of mangrove plants contribute to the growth and establishment of these ecosystems. Additionally, specific patterns of root exudates, different rhizosphere microenvironments, and mangrove substrates can profoundly influence the diversity of microbial populations (HUERGO *et al.*, 2018; ZHUANG, 2020; SEHOANE, 2023). The rhizosphere demonstrates an abundance of various microbial groups, including mycorrhizal fungi, endophytic bacteria, and viruses, as well as the predominance of r and k strategists (KUZYAKOV, 2019). However, in recent years, the ability to biodegrade contaminants through rhizodegradation or phytostabilization by rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) has been the focus of greater attention and investigation (MALICKA *et al.*, 2022; SEHOANE;

THACHARODI, 2023). Understanding these interactions is essential for the effective conservation and rehabilitation of these ecosystems, given the strong relationship between mangrove health and the microbial community (LAI *et al.*, 2022). In this study, we provide the first information on bacterial and AMF communities, with biotechnological potential, associated with roots and rhizosphere of plants in the Mangue de Pedra of Búzios.

1.1. Stone Mangroves In The World And In Brazil

Mangrove substrates are classified into four types: swampy, peaty, rocky, and sandy, where the first two types support well-developed mangrove forests, while sandy-rocky substrates have underdeveloped forests distributed over solid volcanic rock, stones, and coral reefs (RITCHIE, 2005; FRANÇA, 2020; OHNO, 2022). Although globally rare, mangroves on rocky sediments are found in the Galápagos Islands, growing directly on solid lava fields, in an inhospitable environment, and with the absence of permanent rivers and estuaries (MOITY *et al.*, 2019). In the Andaman and Nicobar Islands, India, mangrove vegetation is distributed over igneous rocks and coral and limestone formations (BANDOPADHYAY *et al.*, 2017). BOMFIM *et al.* (2019) mention other examples in Japan and Recife (Brazil). Still in Brazil, in the municipality of São José do Ribamar, Maranhão state, a fringe-type mangrove develops on the Unicamping-Juçatuba beach, in the presence of stones and rock blocks, and alluvial substrate. Its formation consists of sandy and clayey sediments covered by lateritic gravel, originating from abrasive erosion processes of cliffs, creating an environment with high touristic potential (BANDEIRA, 2020).

The municipality of Armação dos Búzios, RJ, has three stone mangroves, located at: Ponta da Sapata, in Manguinhos; Foca Beach; and Gorda Beach, in Rasa, covering a total area of 0.014 km² and a contributing basin of 0.180 km² (BOMFIM, 2019). These mangroves are located in the part of American territory that remained connected to the African continent after Mesozoic rifting, known as the Búzios Orogeny (SCHMITT, 2001). The Mangue de Pedra in Gorda Beach, area of this study, stands out from other mangroves globally due to its location an important lithological scenario of geological fault systems within a tectonic framework, the São João da Barra Graben (MOHRIAK

et al., 1990). This Graben facilitated the formation of the Pai Vitório geological fault, which brings into contact Paleoproterozoic orthogneisses and orthogneiss amphibolites approximately 2 billion years old with conglomeratic sediments of fluvial origin from the Barreiras Formation, dated to the Miocene, approximately 20 to 2 million years ago (MOHRIAK *et al.*, 1990; DIAS *et al.*, 2019; SCHMITT, 2001). The Pai Vitório geological fault creates traps and barriers for the Mangue de Pedra aquifer, with a less saline channel and alluvial fan deposition of sediments composed of intercalations of gravel, sand, and clay (CICCO, 2018; ALBUQUERQUE, 2022). The groundwater level in the aquifer varies from 25 meters above sea level, with the emergence of rainwater at Gorda Beach, altering local salinity (MANSUR, 2017; DA SILVA, 2018). The presence of erosion-resistant chalcedony breccia blocks protects mangrove trees from tidal energy variations (ALBUQUERQUE *et al.*, 2022).

Considered the third most scientifically significant geosite in the CFTD (Cabo Frio Tectonic Domain), the Mangue de Pedra has been proposed to UNESCO as an International Geopark, being one of the most relevant in the country in terms of geology integrated into the Geopark Shores and Lagoons of the State of Rio de Janeiro project (MANSUR, 2010). Despite its significant ecological, scientific, economic, and social importance, this ecosystem is threatened by real estate speculation. Additionally, the incidence of significant anthropogenic activities, such as the discharge of untreated domestic sewage, improper removal of small shells, and oil spills in the Mangue de Pedra, has increased over the years. In April 2019, crude oil pellets reached the Mangue de Pedra, following an accident on the P-53 platform located in the Marlim Leste field, Rio de Janeiro (ANP/SSM; IBAMA, 2020). Another notable incident occurred in January 2022, following a major discharge of effluents into the Rio Una, affecting Gorda Beach.

2. Material & methods

Sampling

Distributed along the intertidal zone of the mangrove, root and rhizosphere samples from four plants were collected, totaling eight samples (Table 1). At Station (1), the

plant analysed was the mangrove *Avicennia schaueriana* (Stapf & Leechm), located in a more sheltered area of the mangrove with developing mangrove seedlings, algae, and mosses, and absent of nearby constructions. Station (2) featured the grass *Spartina sp.*, while Station (3) included *Rhizophora mangle* (L. – Rhizophoraceae), both located in clearings without surrounding mangrove vegetation and close to the main access trail of the mangrove. Station (4) included the mangrove *Avicennia schaueriana* (Stapf & Leechm), the only mangrove present at this point, situated near the Fishermen's Village and the Rasa stream. The collections were carried out at low tide in May 2023 (Autumn). The four sampling stations (Figure 2) were georeferenced using the Compass application and GPS (Global Positioning System) by Seong Eon Kim, Eonsoft version 5.5.9.

Figure 1 - Location of the sampling stations in Mangue de Pedra, Búzios. At Station (1), the analysed plant was the mangrove *Avicennia schaueriana*. Station (2) featured the grass *Spartina sp.* Station (3) had the mangrove *Rhizophora mangle*. Station (4) included the mangrove *Avicennia schaueriana*

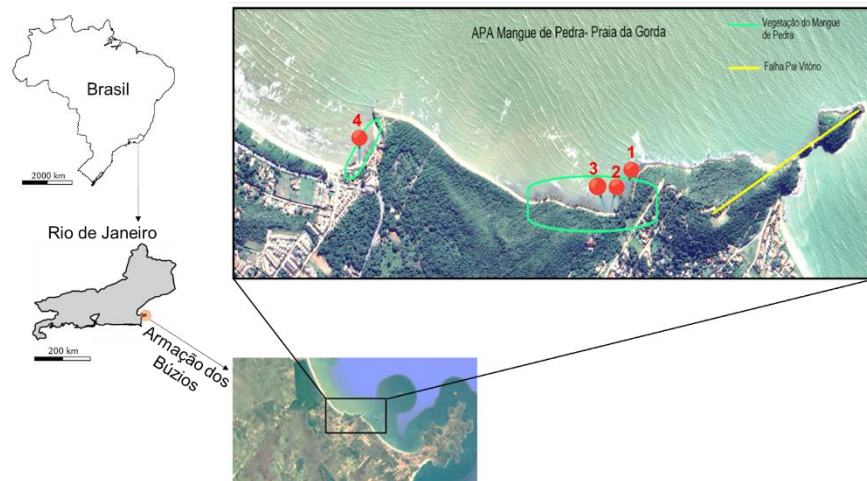


Tabela 1. Location of the sampling stations near the plants in Mangue de Pedra, Búzios.

Sampling stations	Plants	Latitude (S)	Longitude (W)
1	<i>Avicennia schaueriana</i>	22° 43'59"	41°57' 50"
2	<i>Spartina sp.</i>	22° 43' 60"	41°57' 52"
3	<i>Rhizophora mangle</i>	22° 43' 60"	41°57' 52"

2.1. Taxonomic characterization of AMF populations

2.1.1. Morphological analysis of AMF populations

For taxonomic analyses of AMF, 100g of rhizosphere sediment from the four sampling points were analysed to extract AMF spores amples were subjected to the decantation and wet sieving method using sieves with meshes of 450, 53 and 38 μc , followed by centrifugation in water at 3,000 rpm for 3 minutes and then in a 50% sucrose solution at 2,000 rpm for 3 minutes. (GERDEMANN; NICOLSON, 1963; JENKINS, 1964). Stereoscopic magnifying glass was used (400x magnification) for glomerospores counting. To observe the morphology and size of the spores, slides were prepared with PVLG (polyvinyl alcohol-lactoglycerol) and MELZER reagents, and observed under an optical microscope (Novel BM 2100) coupled to the image capture camera (Toup CAM UCMOS05100KPA). The images were captured in the Toup View program and processed in the Toup Lite and ImageJ programs. Analyses were carried out at the Environmental Ecotoxicology Laboratory of the Federal Fluminense Institute - *Campus Cabo Frio*.

2.1.2. Molecular analysis of AMF populations

Initially the extraction of nucleic acids contained in root and rhizospheric sediment of the eight samples was carried out using the *DNeasy® PowerSoil®* kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. The molecular marker routinely used to characterise fungal communities is the ribosomal internal transcribed spacer (ITS), but this subunit alone is not efficient for AMF due to the high rate of variability and nonspecificity for AMF (DELAVAUUX; MALICKA, 2022). In this context, the small SSU rDNA portion is the region commonly used for environmental sequencing for FMA, where its database is better developed and reliable because it is evolving more slowly than the region (ITS), being supported to build phylogenetic trees for placement of clades (FRANCK, 2020; ÖPIK, 2013). The amplified region of DNA used was from the 5' end of the 18S gene of the 800bp Small SubUnit ribosomal rRNA

(SSU rRNA) fragment according to (SEHOANE, 2023) and adaptations. PCR amplifications were performed individually on DNA extracted from rhizospheric sediment and plant roots from the Mangue de Pedra Búzios. A first PCR was performed using universal fungal primers NS1-NS4 (5' GTA GTC ATA TGC TTG TCT C 3' -5' CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG 3'; Síntese Biotecnologia) and a second PCR with specific primers AML1-AML2 (5'ATC AAC TTT CGA TGG TAG GAT AGA 3' - 5' GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC C 3'; Synthesis Biotechnology). Both PCRs were performed using 0.2 µl (5U/µl) of Taq Platinum polymerase (Invitrogen), 0.5 µl dNTPs (10mM) (Promega), 0.75 µl MgCl₂ (50Mm) and 1.25 µl of each primer (NS1/4) / (AML1/AML2) in a final volume of 20 µl. PCR products were analysed by performing 1.5% agarose gel electrophoresis with SYBR Safe DNA (Invitrogen) at 100 V for 30 min and then observed under UV light. Positive PCR products (800 bp amplicons) were cleaned by the purification technique using the Purification Genomic DNA Wizard® kit. The analyses were carried out at the Genetics Laboratory of the Institute Almirante Paulo Moreira, Campus Arraial do Cabo. The PCR product was purified with Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) according to the manufacturer's instructions. Sequencing analyzes were carried out on the DNA Sequencing Platform (PSEQDNA-UFRJ) of the Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, UFRJ, using the SeqStudio™ Automatic Sequencer (AppliedBiosystems – ThermoFisher). The data generated by sequencing were edited manually with the BioEdit program (version 7.2.5). The peaks of the electropherograms were evaluated and the initial and final portions of the sequences were removed as they were of low quality, in most cases. The sequences obtained after editing (around 800bp) were compared with sequences deposited in public access databases Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the BLAST tool (Basic Local Alignment Search Tools) (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Sequences were aligned and evolutionary analysis were performed using *MEGA 11 software* (version 11.0.13) (Tamura *et al.*, 2021). The evolutionary history and phylogenetic tree were constructed using the Maximum Likelihood method and the general Time reversible (GTR) model with gamma distribution (+G= 2.0774) in 1000 replicates. Samples registered in the National Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge Management System (SisGen) of the Ministry of the Environment (MMA): Access Registration Number AF93758.

2.2. Analysis of cultivable bacteria populations

For the isolation of bacteria associated with rhizosphere sediments and vegetable roots, approximately 1g of sample was macerated and resuspended in sterile 0.9% NaCl and cultivated in glass tubes containing the liquid bacterial medium Tryptone Soy Broth (TSB). After checking and monitoring bacterial growth by optical density (630nm), each sample was serially diluted (10^{-1} to 10^{-5}) and inoculated into Petri dishes using the Spread-Plate method with the aid of a loop Drigalski. Each plate was previously prepared with 20mL of the respective media with the addition of 1.5% Agar. Colonies were observed on the respective 10^{-5} dilution plates and selected for isolation of pure cultures using the simple streak depletion technique in petri dishes. Colonies were initially isolated based on morphological characteristics and subsequently selected with distinct morphologies for molecular identification.

2.2.1. Molecular analysis of cultivable bacteria populations

For molecular identification of the selected bacteria, total genome was extracted using the *Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)* according to the manufacturer's instructions. Quantity and quality of 25 μ L of eluted DNA was checked using NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and the integrity of the DNA was assessed by electrophoresis in a 1% agarose gel. After DNA extraction, the 16S rRNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) according to Susilowati et al (2015), using universal primers 27F and 1492R according to Weisburg et al. (1991) in the Veriti™ 96-Well model thermocycler (ThermoFischer Scientific). PCR reaction consisted of *GoTaq® Green Master Mix Promega 2X*, primer 27F and 1492R (10 μ M), extracted DNA 15-25ng and ultrapure water. The following cycling conditions were used: initial denaturation at 95°C for 3 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. A final extension was performed at 72°C for 7 min. The PCR products were analysed by electrophoresis in a 1% agarose gel to verify fragments amplification of 1500 base pairs (bp). The 1% agarose gel was prepared in 1X TBE buffer and 2 μ L of Safer 10000X dye (Kasvi). Samples were applied to the gel and the electrophoresis runs were carried out at 80V for 40 minutes in an electrophoresis tank with 1X TBE buffer. Subsequently, the gel was observed with E-Gel™ Imager UV Light Base

(ThermoFisher Scientific). The PCR product was purified with Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) according to the manufacturer's instructions. Sequencing analyses were carried out on the DNA Sequencing Platform (PSEQDNA-UFRJ) of the Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, UFRJ, using the SeqStudio™ Automatic Sequencer (AppliedBiosystems – ThermoFisher). The data generated by sequencing were edited manually with the BioEdit program (version 7.2.5). The peaks of the electropherograms were evaluated and the initial and final portions of the sequences were removed as they were of low quality, in most cases. The sequences obtained after editing (around 1050bp) were compared with sequences deposited in public access databases Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the BLAST (Basic Local Alignment SearchTools) (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Sequences were aligned and evolutionary analysis were performed using *MEGA 11 software* (version 11.0.13) (Tamura *et al.*, 2021). The evolutionary history and phylogenetic tree were constructed using the Maximum Likelihood method and the Tamura-Nei model with gamma distribution (+G = 0.5407) in 1000 replicates. Samples registered in the National Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge Management System (SisGen) of the Brazilian Ministry of Environment: Access Registration Number ACB699E.

2.3. Physico-chemical Analysis

To evaluate the biological dynamics of AMF and bacteria present in the rhizospheric sediment and plant roots in the mangrove, water physical parameters were measured *in situ* at the four stations using a standard centigrade mercury thermometer to evaluate the temperature (°C), a refractometer (Instruter) for the analysis of salinity (‰) and identification of the pH in the range 0-14, Universal indicator kit (Merck kGaA, 64271 Darmstadt, Germany). To understand the biological dynamics of AMF and bacteria present in the rhizospheric sediment and plant roots in the mangrove, water samples were collected at the four points studied for turbidity and nutrients analysis. Nutrient measurement was based on colorimetric techniques in accordance with *A Practical Handbook of Seawater Analysis* (STRICKLAND; PARSONS, 1972.) The nutrients nitrite (NO₂⁻), nitrate (NO₃⁻), phosphate (PO₄³⁻) and ammonium (N- NH₄⁺) were quantified according to calibration curves, using standard

solutions to obtain the results. The device used to determine these compounds was an optical spectrophotometer (Spectronic 20D). All these analyses were carried out in the Institute for Marine Studies Admiral Paulo Moreira Chemistry Laboratory.

3. Results

3.1. Morpho-taxonomic characterization of AMF populations

Several glomerospores were found in the rhizospheric sediment samples. Despite the variety of spores found, the identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) at the species level based on morphology is limited due to morphological differences among species within the same genus (KRUGER et al., 2012). In our analyses, it was possible to observe a broader identification coverage in the distribution of sampling points using both morphological and molecular analyses. Morphotaxonomic identification (Table 2) in this study was conducted by AMF taxonomy experts, relying on specific literature and the database of the International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) website.

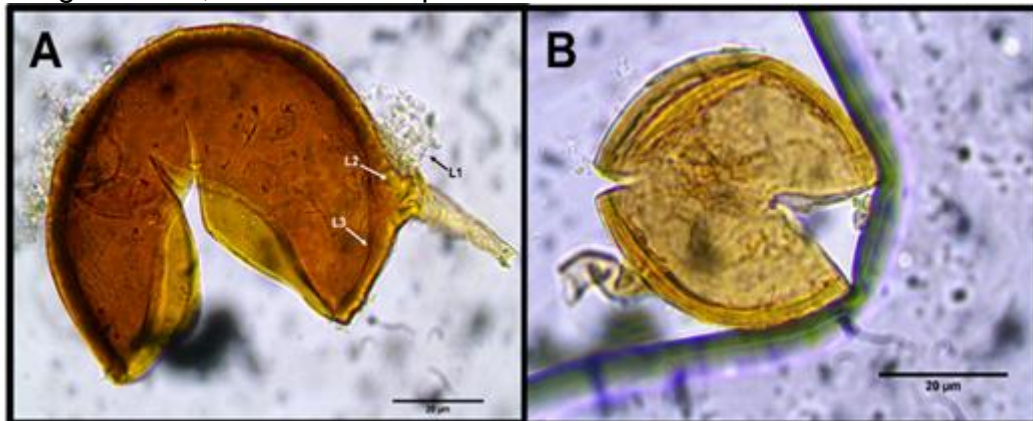
Tabel 2. Morpho-taxonomic results of the spores found in the rhizosphere of the 4 sampling sites in the Mangue de Pedra, Búzios Mangrove.

COLLECTION STATIONS	VEGETABLE	NUMBER OF SPORES	FAMILIES	GENDER	SPECIES
1	<i>Avicennia Schaueriana</i>	37	<i>Glomeraceae</i>	<i>Funneliformis</i>	<i>Funneliformis aff. Mosseae</i>
2	<i>Spartina sp.</i>	26	<i>Glomeraceae</i>	x	x
3	<i>R. mangle</i>	25	<i>Glomeraceae</i>	x	x
4	<i>Avicennia Schaueriana</i>	25	<i>Glomeraceae</i> <i>Acaulosporaceae</i> <i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus</i>	<i>Paraglomus aff. occultum</i>

3.1.1. Morphological analysis of AMF

Figure 2. A) Glomerospore *Funneliformis aff. mosseae* isolated from the rhizosphere sediment of the mangrove *Avicennia schaueriana* (Collection Station 1). Lens with 1000x magnification, scale bar = 20µm. B) Glomerospores of the Glomeraceae Family isolated from the rhizosphere sediment of the mangrove *Avicennia schaueriana*

(Collection Station 1) in the Mangue de Pedra, Armação dos Búzios, under a lens with 1000x magnification, scale bar = 20µm.



Source: Author

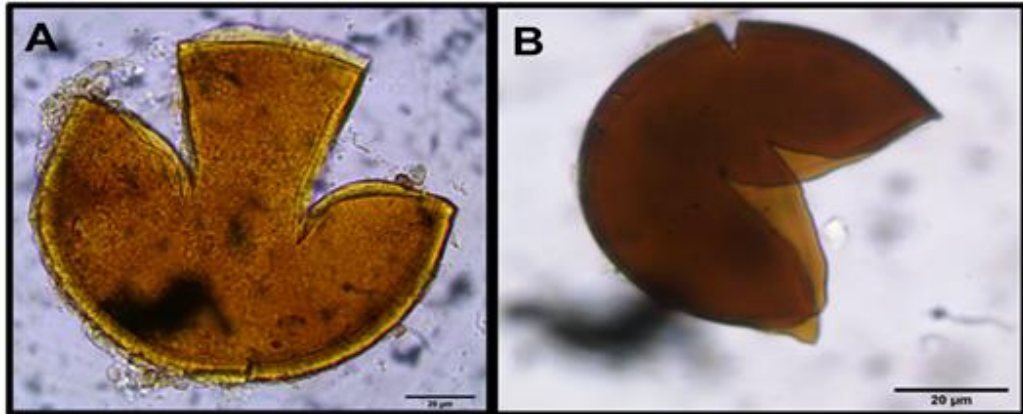
Figure 3. Glomer spores of the Glomeraceae family isolated from the rhizosphere sediment of the marine grass *Spartina sp.* at (Collection Station 2) in the Mangue de Pedra, Armação dos Búzios. Images A-C with 1000x magnification and D with 400x magnification, scale bar = 20µm.



Source: Author

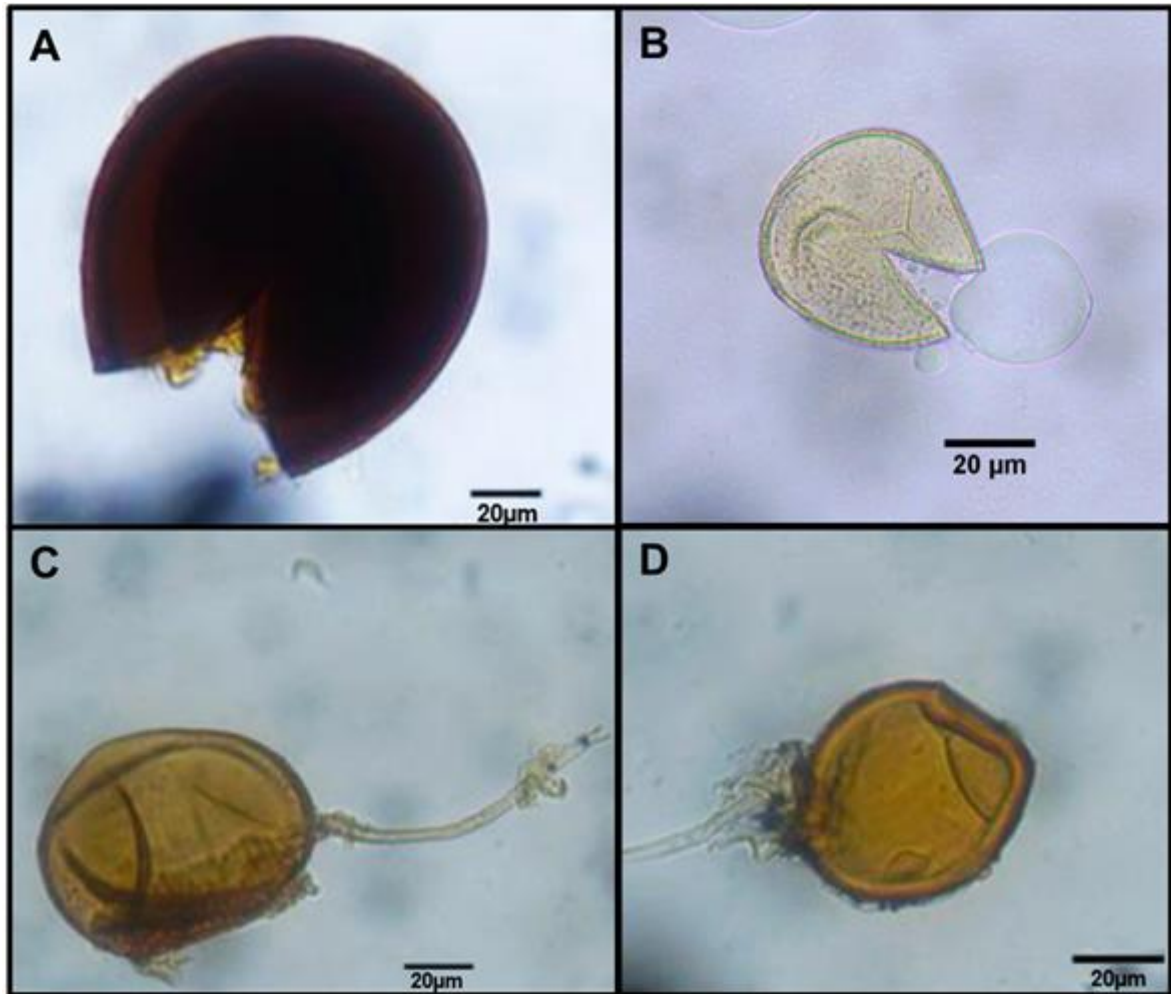
Figure 4. Glomer spores of the Glomeraceae family isolated from the rhizosphere sediment of *Rhizophora mangle* at (Collection Station 3) in the Mangue de Pedra,

Armação dos Búzios. Images captured under a lens with 1000x magnification, scale bar = 20µm.



Source: Author

Figure 5. Glomerospores isolated in the rhizospheric sediment of *Avicennia schaueriana* at sampling Station (4) in the Mangue de Pedra, Armação dos Búzios. Images A and B were captured under a 1000X magnification lens and C and D under a 400X magnification lens. A) *Acaulosporaceae* family. B) *Paraglomus aff occultum*. (C-D) *Glomeraceae* family. The only spore of the genus *Paraglomus* sp (B) without the observed hyphae makes it difficult to identify and compare the structures with other spores of this species. However, molecular characterization identified the existence of *Paraglomus occultum* in the Mangue de Pedra Armação dos Búzios. The approximate size of 50 µm is below the minimum average size (60-100 µm) reported in the literature. To preserve possible specific mistakes, the description by *Paraglomus aff occultum* was chosen.



Source: Author

3.1.2. Molecular Taxonomic Identification AMF

The molecular results for Glomeromycota fungi (Figure 6) from the Mangue de Pedra mangrove showed the presence of the species *Paraglomus occultum* (C. Walker) J.B. Morton & D. Redecker, *Acaulospora spinosa* C. Walker & Trappe, *Funneliformis mosseae* (T.H. Nicolson & Gerd.) C.Walker & A. Schüssler, *Scutellospora calospora* (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders, *Acaulospora cavernata* Blaszk

Figure 6. Phylogenetic tree of FMA based on the partial analysis of the SSU-rRNA region from different Glomeromycota sequences. Using the evolutionary substitution model, Maximum Likelihood method for evolutionary reconstruction, with 1000 Bootstraps and support values above 60%. *GenBank accession numbers for each sequence reference are shown in parentheses, with our sequences corresponding to sampling station 1 (triangle), 2 (square), 3 (diamond), and 4 (circle). Black and red symbols represent rhizosphere and root samples, respectively. *Boletus edulis* was used as an outgroup.



Source: Author

3.2. Molecular Identification Of Isolated Strains

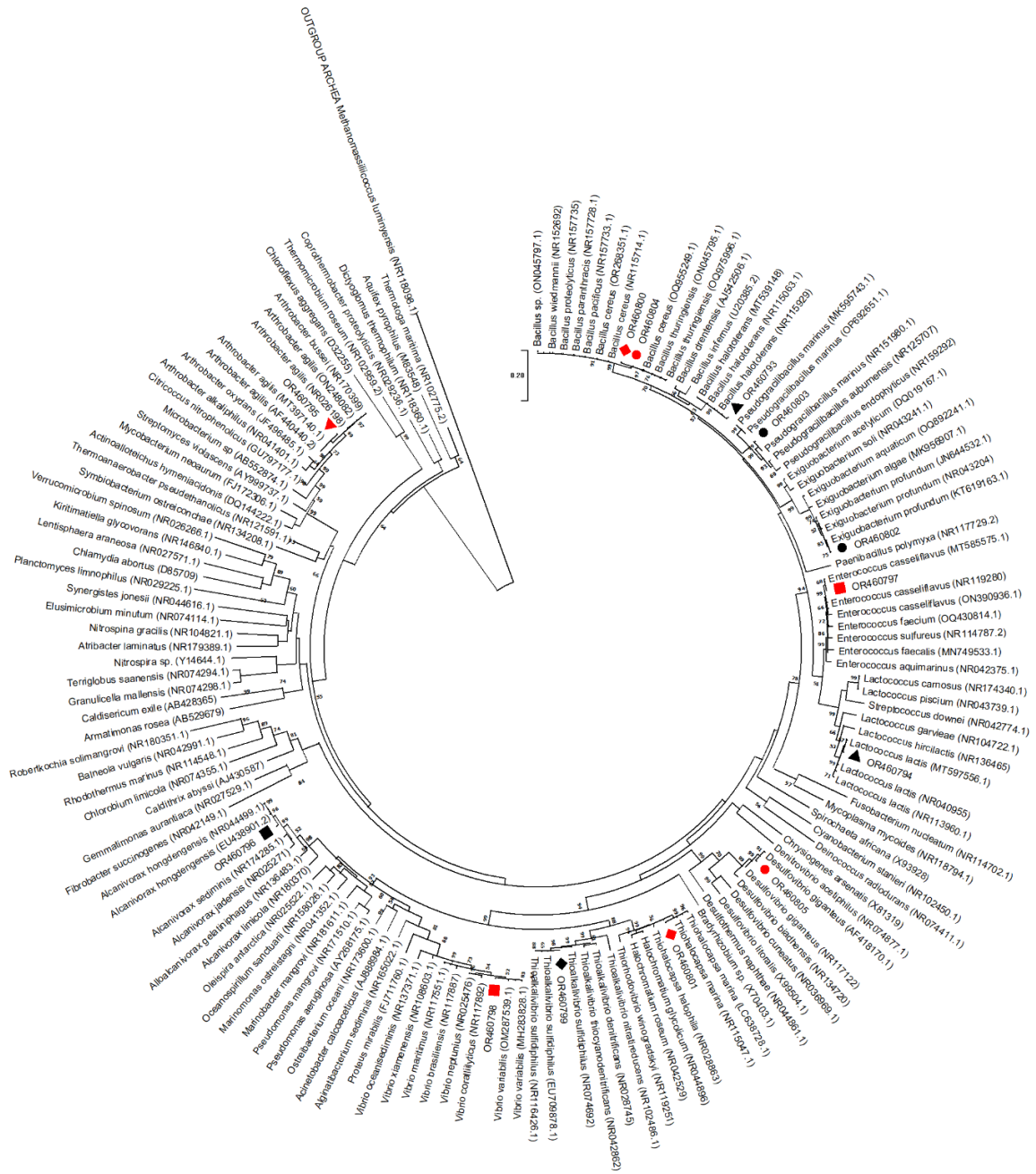
A total of 13 bacterial strains isolated in culture were characterised at the species level through partial sequencing of the 16S rRNA gene and comparison with homologous sequences deposited in the GenBank database. Molecular identification revealed 11 bacterial genera through Sanger nucleotide sequencing: *Alcanivorax*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Desulfovibrio*, *Enterococcus*, *Exiguobacterium*, *Lactococcus*, *Pseudogracibacillus*, *Thiohalocapsa*, *Thioalkalivibrio*, and *Vibrio*.

Table 3. Phylogenetic representation of 13 bacterial species and 11 genera identified in the Mangue de Pedra.

COLLECTION STATIONS	VEGETABLE	PHYLOGENETIC CLASSIFICATION		
		ORDER	GENDER	SPECIES
		<i>Bacillales</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus halotolerans</i>
1	<i>A. schaueriana</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
		<i>Micrococcales</i>	<i>Arthobacter</i>	<i>Arthobacter agilis</i>
		<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio variabilis</i>
2	<i>Spartina sp.</i>	<i>Oceanospirillales</i>	<i>Acanirovax</i>	<i>Acanirovax hongdengensis</i>
		<i>Lactobacillales</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
		<i>Chromatiales</i>	<i>Thioalkalivibrio</i>	<i>Thioalkalivibrio sulfidiphilus</i>
3	<i>R. mangle</i>		<i>Thiohalocapsa</i>	<i>Thiohalocapsa Marina</i>
		<i>Bacillales</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp.</i>
4	<i>A. schaueriana</i>		<i>Exiguobacterium</i>	<i>Exiguobacterium profundum</i>
		<i>Bacillales</i>	<i>Pseudogracibacillus</i>	<i>Pseudogracibacillus marinus</i>
			<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
		<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Desulfovibrio giganteus</i>

Figure 7. Phylogenetic tree was constructed based on the 16S rRNA gene sequences of bacterial strains isolated from Mangue de Pedra samples. The sequences obtained after editing (approximately 1050 bp) were compared with sequences deposited in the publicly accessible GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) tool (ALTSCHUL et al., 1997). The sequences were aligned and evolutionary analyses were conducted using the *MEGA 11 software*

(version 11.0.13). The evolutionary history and phylogenetic tree were constructed using the Maximum Likelihood method and the Tamura-Nei model with gamma distribution (+G = 0.5407) in 1000 replicates. Collection Station 1 (triangle), 2 (square), 3 (diamond), and 4 (circle). The symbols in black and red represent rhizosphere and root samples, respectively. *Methanomassiliicoccus luminyensis* was used as the outgroup



Source: Author

4. Discussion

Despite the limited number of measurements taken, the general values of the physicochemical properties of the soil and seawater (salinity, pH, temperature, and

nutrients) measured at four points distributed throughout Pedra Mangrove in this study were similar. Therefore, the differences observed in microbial composition between the collection stations cannot be directly attributed to environmental conditions but are likely due to potential synergistic interactions between the measured environmental factors and the biotic factors of the Mangue de Pedra.

Research in mangrove forests has demonstrated that microbial communities are influenced by various biotic and abiotic factors (BERG; SMALLA, 2009; DE SANTANA *et al.*, 2021; LAI *et al.*, 2022). Factors such as plant age, root type, soil grain size, pH levels, salinity, and temperature play a significant role in determining microbial diversity, affecting the prediction of fungal-bacterial dominance in mangroves (HELFER; HASSENRÜCK, 2021; LAI *et al.*, 2022). However, most of these studies have been conducted in mangroves with muddy sediments in riparian and delta landscapes. In this study, we provide the first information on bacterial communities and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) associated with vegetation in the Mangue de Pedra, which grows on a sandy-rocky substrate and lacks direct river influence.

Salinity is a key factor affecting microbial diversity and community structure in coastal sediments, with higher diversity observed at intermediate salinities (BARIK *et al.*, 2018; LAI *et al.*, 2022; BERNHARD *et al.*, 2005). The Mangue de Pedra, with salinity values between 23 and 28 ppt, represents an intermediate brackish environment. In contrast, high salinity mangroves typically range from 33 to 64 ppt, while intermediate salinity environments are between 10 and 30 ppt (BARIK *et al.*, 2018; BERNHARD *et al.*, 2005; LAI *et al.*, 2022).

The second key factor influencing microbial structure, after salinity, is pH, which acts as a limiting factor for metabolic activities (CECCON *et al.*, 2019). Our results showed that pH values were within the neutral range, aligning with previous studies that demonstrated the influence of mineral acids and alkalinity from bicarbonates in the tide pools of Pedra Mangrove (REBELO, 2013; BENFEITA, 2017).

Understanding the interaction of microbial populations and their role in nutrient cycling in the tidal zones of mangroves is essential for the adaptation and conservation of these ecosystems (DE SANTANA *et al.*, 2021; TRIVEDI *et al.*, 2020). Environmental parameters influence ammonia-oxidising bacteria, which are important in the nitrogen cycle in mangroves (LAI *et al.*, 2022). In Mangue de Pedra, we observed diazotrophic bacterial species in all sampling stations, both in rhizosphere sediment and in the roots,

such as *Gammaproteobacteria*, *Actinomycetota*, and *Desulfovibrionaceae* (ALFARO-ESPINOZA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2017). These diazotrophs are crucial for nitrogen recycling, including nitrification, fixation, denitrification, and ammonia removal in eutrophied mangrove environments (WANG *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019; ALFARO-ESPINOZA *et al.*, 2015).

All sampling stations in Manguê de Pedra, except station 1, showed nitrate levels higher than 5 µM, possibly due to anthropogenic events and frequent effluents in the area, mainly brought by the Una River. Nitrate concentrations above 5 mg/L may indicate contamination from anthropogenic activities, where the presence of nitrite in groundwater is a sign of recent pollution (BENFEITA, 2017). Station 1, geographically more protected and farther from the main mangrove trail, has a higher density of mangrove trees and seedlings, suggesting a less disturbed site. Station 4 had the highest nitrate, ammonium, and nitrite levels, possibly associated with effluents from the Fishermen's Village and the proximity to the Rasa stream. In addition to nutrient results, the salinity of sampling stations 1 and 4 showed greater discrepancies.

HALDAR *et al.* (2018), report that mangrove sediments heavily influenced by raw sewage and anthropogenic activities have lower microbial diversity and taxonomic richness compared to those with less human intervention. Thus, assessing and comparing microbial diversity and surrounding conditions in Manguê de Pedra is necessary to analyse this relationship with long-term environmental changes.

In addition to nutrients, temperature can influence the rhizosphere environment by increasing the retention of organic products and microbial activity (KUZYAKOV *et al.*, 2019; RAZAVI *et al.*, 2019). In the present study, the average temperature of 26 °C was not extreme enough to significantly alter microbial composition.

To understand the formation of microbiomes associated with plants in Manguê de Pedra, we analysed the plant compartments, rhizosphere, and roots for bacterial characterization. In all plant samples from the collection stations, our results showed the dominance of the Phylum Firmicutes, represented by species such as *Bacillus halotolerans*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus casseliflavus*, *Bacillus sp.*, *Exiguobacterium profundum*, *Pseudogracilibacillus marinus*, and *Bacillus cereus*. To a lesser extent, the Phylum Proteobacteria was observed, represented by *Gammaproteobacteria* species like *Alcanivorax hongdengensis*, *Thioalkalivibrio sulfidiphilus*, *Vibrio variabilis*, and *Thiohalocapsa marina*.

In South America, several studies report Firmicutes as the most dominant phylum, particularly due to the Bacillaceae family (FERNÁNDEZ-CADENA *et al.*, 2020; ISAZA *et al.*, 2021; SANTANA *et al.*, 2021). The proportion of Proteobacteria is reported in mangroves as the second most dominant phylum, with minimal percentage differences compared to Firmicutes (LAI *et al.*, 2022). The prevalence of Firmicutes and Proteobacteria in both roots and the rhizosphere suggests a selective pressure from the plants on the microbial communities in Mangue de Pedra. Environmental conditions and geomorphology may influence the composition of microbial communities according to the type of plant (CHUNHUA *et al.*, 2023; TRIVEDI *et al.*, 2020; LAI *et al.*, 2022).

In the plant's root, from Mangue de Pedra, we observed the distribution of bacteria from *Proteobacteria*, *Desulfovibrionales*, *Pseudomonata*, *Actinomycetota*, and a higher distribution of *Bacilli*. This microbial distribution and organisation suggest a selection for the endophytic environment with specific microbial functions.

Common bacterial groups in mangroves include nitrogen-fixing rhizobacteria represented by Proteobacteria; phosphate-solubilizers such as *Bacillus*, *Vibrionaceae*, and *Pseudomonata*; and sulfate-reducers represented by *Desulfovibrio* (HOLGUIN *et al.*, 2001; THATOI *et al.*, 2013; LAI *et al.*, 2022).

The genus *Bacillus* is frequently found in soil, wastewater, and mangrove sediments, where halotolerant bacterial genera also play important roles in plant-microorganism interactions, such as nitrogen fixation, plant growth promotion, and pathogen protection (ALMEIDA *et al.*, 2021; SHAHRAJABIAN, 2023). The Bacillaceae family has metabolic potential in carbohydrate pathways (citrate cycle and pentose phosphate pathway) as well as sulphur and nitrogen metabolism, suggesting their abundance in tidal zones (DE SANTANA *et al.*, 2021; SPEALMAN *et al.*, 2020; LAI *et al.*, 2022). Literature frequently reports the dominance of Firmicutes and low abundance of other species in microbial diversity, especially in intertidal zones, where Bacilli is predominantly represented (ISAZA *et al.*, 2021; FERNÁNDEZ-CADENA *et al.*, 2020; DE SANTANA *et al.*, 2021; CECCON *et al.*, 2019; LAI *et al.*, 2022).

In collection stations 1 and 4, despite differences in nutrient levels, the Bacilli group also predominated, suggesting a possible selectivity by the plant *Avicennia*

schaueriana. The dominance of Bacilli found both in the rhizosphere and in the roots of plants in Mangue de Pedra suggests a heterogeneous amplification and selection associated with the assembly of microbial communities. This assembly is likely related to specific microbial functions, controlling the entry of microorganisms into the roots and the microbial diversity regulated by root exudates (TRIVEDI *et al.*, 2020; ZHUANG *et al.*, 2020). Root exudates in mangroves, such as amino acids, organic acids, polyhydroxy acids, sugars, phosphates, phenolic acids (phthalic acid, salicylic acid), and fatty acids (palmitic acid, myristic acid, and oleic acid) in large quantities, could attract more probiotics that protect the host plants (BAIS *et al.*, 2006; ZHUANG *et al.*, 2020).

Different patterns of bacterial and fungal communities may occur due to niche differentiation along the root compartments and the effects of mangrove root exudates (LUO *et al.*, 2018; SAKHIA *et al.*, 2016; ZHUANG *et al.*, 2020). Our FMA results, obtained through morpho-taxonomic techniques, revealed glomerospores belonging to the phylum Glomeromycota in all analysed rhizosphere sediments, with the highest occurrence in Glomeraceae (3 out of 4 collection stations), followed by Acaulosporaceae. The presence of FMA glomerospores in Mangue de Pedra sediments of *A. schaueriana* was also observed by Bomfim (2019) using the morpho-taxonomic technique, which supports our findings.

In the molecular results for AM fungi in Mangue de Pedra, we identified species also found using morpho-taxonomic techniques. The presence of *Paraglomus occultum* and *Funneliformis mosseae*, identified by both methods, showed distinct distribution across the collection stations. This scenario was beneficial as it allowed for a broader geographic coverage of AM fungi distribution and reduced potential identification errors. In this context, the combination of molecular and morphological studies is considered the most suitable methodology for classifying AM fungi and describing their geographic distribution (COFRÉ *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2022; LEE *et al.*, 2008).

In collection stations 1 and 4, the identification of AM fungi of the genus *Acaulospora* in *A. schaueriana* highlighted its widespread distribution in the region and its ability to adapt to various environmental conditions. Despite the presence of *Acaulospora* in the same mangrove species, the host plant biotype seems to exert selective pressure on the structure of endophytic fungal communities in the rhizosphere (LEE *et al.*, 2020; ZENG *et al.*, 2024).

In collection station 3, AM fungi were not identified in the root of the single, recent, *Rhizophora mangle* specimen using molecular techniques; only *Scutellospora calospora* was observed in the rhizosphere sediment. Although AM fungi were not identified in the root, it cannot be concluded that endophytic colonisation is absent, given that only a single sample was collected. Using morpho-taxonomic techniques, glomerospores were observed in the rhizosphere sediment, corroborating the molecular findings. The presence of AM fungi only in the rhizosphere sediment may be due to glomerospores being carried by tidal variation or coastal vegetation. Dispersal via fluvial-marine waters, animals, and coastal vegetation are reported as means of AM fungi transport (SCHMIDT *et al.*, 1986; DA SILVA *et al.*, 2017). Further monitoring of *R. mangle* is needed to clarify this result.

Another relevant factor was the low phosphate demand in *R. mangle* compared to other analysed plants in Mangue de Pedra. Mycorrhizal plants absorb phosphorus from the soil through hyphae, extending the depletion zone (KOTHAMASI *et al.*, 2006; SEHOANE *et al.*, 2023). However, phosphorus (P) demand can significantly influence root architecture and AM fungi community composition (MALICKA *et al.*, 2022). Root colonisation by AM fungi is often associated with phosphorus-deficient soils, though spore sporulation can be positively influenced by increased phosphorus in some cases, and negatively in others (EZETA and SANTOS, 1980; NEUMANN and GEORGE, 2004; SUBRAMANIAN *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2012). Phosphorus availability in the soil can affect the efficiency of certain AM fungi species, influencing root colonisation, fungal species composition, and distribution in the environment (PICONE, 2000).

Some plants, such as those in the Rhizophoraceae family, may exhibit an increase in phenolic compounds in cortical cells, forming a physical barrier against intracellular colonisation by AM fungi (RASHIDI *et al.*, 2022). However, KOTHAMASI *et al.* (2006) observed that the soil in the rhizosphere of mangroves like *Rhizophora mucronata*, *Rhizophora stylosa*, and *Bruguiera gymnorhiza* in South Bay, Great Nicobar, India, had low inorganic phosphate levels (0.86 ± 0.42 mg), yet AM fungi of the genus *Glomus* and phosphate-solubilizing bacteria were found, indicating their role in mobilising phosphate in the rhizosphere for these plants.

In our results, *Bacillus sp.* was found in the roots of *R. mangle* in Mangue de Pedra, known for solubilizing phosphate in nutrient-poor mangrove environments and

promoting plant growth and salinity tolerance (GOBINDA et al., 2024; DE SANTANA et al., 2021; SPEALMAN et al., 2020; LAI et al., 2022).

The rhizosphere of *R. mangle* is described as sulphurous, with reduced sulphur compounds (FRUEHAUF, 2005; ANDRADE & PATCHINEELAM, 2000). In the rhizosphere of *R. mangle* in Manguê de Pedra, the bacterium *Thioalkalivibrio sulfidiphilus* was observed, which may play a role in redox reactions in the rhizosphere. This genus is known as a haloalkaliphilic and obligate chemolithoautotrophic sulphur-oxidising bacterium that oxidises hydrogen sulphide (H₂S) as an electron donor, tolerates pH levels from 9.5 to 11, and high sodium concentrations (AHN AC et al., 2017). The genus *Thioalkalivibrio* isolated from various sediments shows genetic diversity, suggested to be genomic species harbouring geographically separated strains or those found only in specific or endemic areas (MORRONE, 1995; FOTI et al., 2006; AHN AC et al., 2017; MUYZER et al., 2011; BECARELI et al., 2020).

5. Biotechnological Applications

The presence of AM fungi from the families Acaulosporaceae and Glomeraceae found in Manguê de Pedra has been reported in hypersaline environments, a wide range of pH levels, as well as in soils contaminated with nickel, cadmium, and arsenic, indicating their biotechnological potential for bioremediation in polluted environments (DA SILVA et al., 2017; DA SILVA et al., 2022; SCHNEIDER et al., 2013; YANO-MELO et al., 2003; HARMANJIT et al., 2023; LEE et al., 2020; MALICKA et al., 2022). Although heavy metals were not measured in this study, the presence of these AMF might to the mitigation of contaminants in Manguê de Pedra, which has been exposed to pollutants in recent years.

The AMF *Funneliformis mosseae*, observed in the grass *Spartina* sp., is known to improve plant nutritional status by mitigating oxidative stress and increasing tolerance to hydrocarbon contaminants (DA SILVA et al., 2022; LENOIR et al., 2016; MALICKA et al., 2021; MALICKA et al., 2022; MARRO et al., 2022). Despite AMF's adaptability to hydrocarbon exposure, the decrease in their richness could favour the dominance of *Funneliformis*, whose functional characteristics stimulate the activities of hydrocarbon-degrading bacteria (MALICKA et al., 2022).

Bacteria can form biofilm-like structures on the surfaces of AMF hyphae (MIQUEL GUENNOG, *et al.*, 2018; TAKTEK *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2020). In our results, the bacterium *Alcanivorax hongdengensis*, identified in the rhizosphere of *Spartina sp*, possesses genes involved in alkane degradation in various oil-polluted marine substrates (WANG *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2009; CAO *et al.*, 2022). Among obligate hydrocarbonoclastic bacteria, *Alcanivorax* is also noted for its ability to biodegrade petroleum-based plastics, such as low-density polyethylene, terephthalate, and polypropylene, and is receiving attention in the plastisphere, a new ecosystem hosting microbial communities on plastic surfaces (CAO *et al.*, 2022). The genus *Thioalkalivibrio*, observed in *R. mangle*, is of industrial interest due to its applications in the oxidation of H₂S produced as a waste in various industrial processes, such as leather tanning, paper manufacturing, oil refining, biogas production, and geothermal sources (BECARELI *et al.*, 2020).

The species *Exiguobacterium profundum* is noted for its biotechnological potential in remediation by sequestering uranium from contaminated marine sediments in southern India (MANOBALA *et al.*, 2019). *Exiguobacterium* strains can produce a variety of enzymes that help them maintain stability across a wide temperature range, including alkaline protease, guanosine kinase, EKTA catalase, ATPases, dehydrogenase, and esterase, and can be found in diverse environments (OZDEMIR *et al.*, 2021).

The *Bacilli* class, found at all collection sites in Mangue de Pedra, is recognized for its potential in bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel-contaminated sediments (SAMPAIO *et al.*, 2019; ABDUL *et al.*, 2022; ALMEIDA *et al.*, 2021; ANU *et al.*, 2024). These microorganisms form biofilms on mangrove plant roots, which facilitates the bioremediation process. Additionally, *Bacillus* extracted from mangroves has been described as a potential biocontrol agent in agriculture due to its production of various extracellular enzymes, including cellulases, amylases, proteases, and chitinases, which have multiple biotechnological applications (OLIVEIRA *et al.*, 2023; SILVA *et al.*, 2023)

6. Conclusion

The Mangue de Pedra, in Búzios, presents unique and rare geomorphological conditions for a mangrove. The research conducted in this ecosystem represents a

significant milestone in understanding the indigenous microorganisms with biotechnological potential associated with the rhizosphere and roots of mangrove plants, which could be used as inoculants or later developed into microbial consortia. Furthermore, while the physical-chemical parameters and nutrient data collected are preliminary, they provide a comprehensive view of the environmental conditions of Mangue de Pedra, contributing to the understanding of its unique ecology and microbial interactions. In this context, a holistic approach that includes a tripartite symbiosis between plants, AMF, and bacteria should be considered in future investigations to understand changes in the functional and structural diversity of these microorganisms, which play a crucial role in ecological interactions and the adaptation of this rocky-sandy sediment mangrove to anthropogenic pressures. Comparing our results with those of other mangroves, we revealed the presence of organisms with similar biotechnological potential, reinforcing the importance of specific studies for rocky sediment mangroves. This pioneering study in the Mangue de Pedra not only provides an initial understanding of ecological interactions, but also establishes a solid basis for the future use of phytoremediation and other biotechnological areas. However, due to its geomorphological rarity and scenic beauty, Mangue de Pedra is threatened by real estate speculation, human activities and environmental changes. The sensitivity of this mangrove requires greater integral conservation protection suggestive of Permanent Protection Units. By promoting the preservation of this rare ecosystem, this research makes a significant contribution to environmental science and the implementation of sustainable management and conservation practices for this mangrove.

7. Acknowledgements

The authors would like to thank The Brazilian Navy and Institute for Marine Studies Admiral Paulo Moreira for personnel and structure support; the Federal Fluminense Institute *Campus* Cabo Frio, Brazil and Búzios City Hall for research sampling licence number 108/2022.