**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Efeito das mudanças climáticas na decomposição de matéria orgânica e
sucessão ecológica em manguezais**

Juanita Hernández Solano

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2017**

Juanita Hernández Solano
Bacharel em Biotecnologia

Efeito das mudanças climáticas na decomposição de matéria orgânica e sucessão ecológica em manguezais

Orientador:
Prof. Dr. **RODRIGO GOUVÊA TAKETANI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Hernández Solano, Juanita

Efeito das mudanças climáticas na decomposição de matéria orgânica e sucessão ecológica em manguezais / Juanita Hernández Solano. - - Piracicaba, 2017.

102 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Manguezais 2. Decomposição 3. Mudanças climáticas 4. Gases do efeito estufa 5. Comunidade bacteriana I. Título

Ofereço

À minha mãe e irmãs,

Pelo apoio incondicional nesta jornada

E por acreditarem em mim.

Sem a força dessas mulheres o caminho seria mais difícil.

Dedico

*Ao verme que primeiro roer as frias carnes do
meu cadáver, como singela homenagem aos pequenos
seres que tudo tornam possível e me fascinam!*

AGRADECIMENTOS

À minha família, por aguentar meus momentos de crise e principalmente pela paciência. Por não me deixarem desistir quando tudo parecia impossível. Mamita Leo, Ana, Dani, Xuxyz y Alicia, las amo!

Ao meu pai, por acreditar em mim e demonstrar interesse no meu trabalho. Obrigada pelo “prateado com a maçã”, sem o qual tudo teria sido mais complicado e lento (principalmente lento).

Ao meu orientador, Dr. Rodrigo Gouvêa Taketani pela orientação, companheirismo, paciência e por acreditar no meu trabalho, muito obrigada!

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado sem a qual não teria conseguido me sustentar nos últimos dois anos.

À Embrapa Meio Ambiente, pela infraestrutura oferecida para realização da pesquisa.

À Dra. Ana Paula Packer por disponibilizar o material, a equipe e tempo para que pudesse efetuar minhas análises de GEE, e à Viviane por ter rodado todas as amostras de gases.

À Dra. Tsai Siu Mui, por disponibilizar o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA para que pudesse realizar as análises de qPCR.

Ao João Luis, sem o qual não teria sido possível coletar o material e por me salvar dos sedimentos do manguezal! “Anda, para e depois puxa, não anda puxando”, lição para uma vida.

À Josiane, pela amizade e paciência! Por responder minhas dúvidas infinitas em relação a tudo, principalmente referentes ao R (haja relação de amor e ódio com um software)! Obrigada pelos scripts e ligações no Skype, mesmo quando tua rotina estava corrida! Pelos almoços (que provaram como AMO comer), por escutar minhas reclamações (também infinitas) e me fazer rir nas horas menos adequadas!

Às minhas colegas de laboratório, (que o universo e tudo mais colocaram no meu caminho) Marta, Laura e Camila, por tornarem a rotina mais agradável, pela ajuda com “meus gases” e os milhões de tubos. Pelas caronas e companhia no calor infernal de Piracicaba e na pacata (porém querida) cidade de Jaguariúna. Marta (aka Miss Cananéia), obrigada por ser minha companheira de mangue e não me abandonar quando a lama ofuscou até minha consciência!

Ao Wallace e Harold, pelo companheirismo! Ao primeiro por tornar menos solitárias as viagens de ônibus durante as frias madrugadas do interior paulista, e ao segundo por hablar conmigo en la lenguita querida y saber todo sobre la FAPESP!

À Isabela Zambello, companheira de profissão! Obrigada pela amizade e por regar minhas plantinhas (que no final deixei morrer)!

À Aline França pela força com minhas amostras e à Júlia Brandão, que respondeu tantas e tantas dúvidas e me motivou durante a escrita! Obrigada por me acolherem tão bem.

À Cecília Zahran, amiga da vida, pelo incentivo constante e carinho.

À Catarina Sofia, miga maravilhosa, principalmente por aguentar minhas crises existenciais, choros, patadas (desnecessárias) e estar sempre ao meu lado. Obrigada por me escutar, acalmar, assistir aquela série péssima comigo e ser do role! Not today Satan!

À Dayane, amiga querida (e completa wandala) que me acompanhou mesmo “longe” durante todo o processo, compartilhando angústias e desejos! Obrigada por alegrar as faxinas semanais ao me apresentar o melhor podcast da estratosfera! Vamos fazer barro acontecer!

Ao Fábio (Zola, maior frangote que você respeita), por me lembrar constantemente do meu amor pela ciência e ter feito que me sentisse em casa naquele final de 2015.

À Iara querida! Obrigada por me hospedar (melhor leitura dramática), escutar, confiar e pelos mil favores na ESALQ! Inclusive, obrigada Moll.

Às minhas amigas queridas de São Paulo, Juliana, Anna, Geovanna, Isabel e Fernanda por entenderem minha ausência e não desistirem de mim! Obrigada pelo companheirismo e por me divertirem na vida paulistana durante todos esses anos. Amudulu!

À Marcela, por não deixar o forninho cair e me ajudar a manter a firmeza na hora da chibata.

À Aline, que caiu de paraquedas junto com uma chuva de glitter, coloriu e deu brilho aos dias de 2017.

À Beatriz Vilela, pelas pidonhas e vírgulas! Obrigada por ter conversado comigo naquele primeiro dia de aula... Melhor consequência da yoga.

À Erica que apareceu nos 45 do segundo tempo, mas me motivou “nas metas semanais”, obrigada mana.

A todos os objetos inanimados que prometi agradecer quando tudo terminasse, porque por algum motivo foram úteis durante o processo.

“O mundo não está em seus livros e mapas. Ele está lá fora!”

J. R. R. Tolkien

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1. Manguezais e sua Importância Ecológica	13
2.2. Vegetação	15
2.3. Solos	18
2.4. Mudanças Climáticas	20
2.4.1. Emissão de gases do Efeito Estufa.....	20
2.4.2. Acidificação e aumento da temperatura das águas oceânicas.....	21
2.4.3. Efeito das Mudanças Climáticas em Manguezais.....	22
2.5. Microbiologia dos Manguezais	23
2.5.1. Métodos moleculares para estudo das comunidades microbianas.....	25
2.6. Sucessão Ecológica	25
2.7. Decomposição de Matéria Orgânica e o Aporte de Carbono Global	26
3. HIPÓTESE	29
4. OBJETIVOS.....	31
4.1. Objetivo Geral	31
4.2. Objetivos Específicos	31
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5.1. Descrição da Área de Coleta	33
5.2. Construção de Microcosmos para Avaliação da Sucessão Ecológica e Efeito das Mudanças Climáticas durante o Processo de Decomposição de Material Vegetal	34
5.3. Determinação da Taxa de Decomposição do Material Orgânico Vegetal	35
5.4. Efeito das Mudanças Climáticas Sobre a Emissão de Gases do Efeito Estufa em Diferentes Fontes de Matéria Orgânica Vegetal.....	36
5.4.1. Amostragem de Gases	36
5.4.2. Análise de Gases e Estimativa dos Fluxos	37
5.5. Extração de DNA da Superfície das Amostras de Material Orgânico Vegetal	37
5.6. Amplificação do DNA das comunidades bacterianas presentes nas amostras de material vegetal por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR – <i>Polymerase Chain Reaction</i>)	38
5.7. Purificação e Quantificação do produto da PCR	38
5.8. Sequenciamento em Larga Escala da Comunidade Microbiana	39
5.9. Análise das Sequências	40
5.10. Quantificação do gene <i>mcrA</i> presente nas amostras por meio de PCR em tempo real	41
5.11. Análise dos Resultados	41
6. RESULTADOS	43
6.1. Degradação do Material Orgânico Vegetal.....	43

6.2. Degradação do Material Orgânico Vegetal em relação à Constante de Decomposição k e Tempo de Meia Vida ($t_{50\%}$)	45
6.3. Emissão de Gases do Efeito Estufa em Diferentes Fontes de Matéria Orgânica Vegetal	47
6.4. Quantificação do gene <i>mcrA</i> (metil coenzima M redutase)	52
6.4.1. Correlação entre o gene <i>mcrA</i> e a Emissão de Metano	54
6.5. Medidas de Alpha (α) Diversidade	54
6.6. Composição da Comunidade Bacteriana	56
6.7. Beta (β) Diversidade Filogenética	60
6.8. Variações na β diversidade Filogenética	66
7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	69
7.1. Degradação do Material Orgânico Vegetal	69
7.2. Emissão de Gases do Efeito Estufa e Abundância do gene <i>mcrA</i>	73
7.3. Diversidade e Composição da Comunidade	78
8. CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	95

RESUMO

Efeitos das mudanças climáticas na decomposição de matéria orgânica e sucessão ecológica em manguezais

Manguezais são ambientes costeiros que proveem diversos recursos para ecossistemas adjacentes devido à alta produtividade decorrente da decomposição de matéria orgânica e principalmente da constante ciclagem de carbono, realizada pelas comunidades microbianas presentes nos sedimentos. Desde a década de 70, com o aumento da liberação de gases pela queima de combustíveis fósseis, diversas anormalidades, como o aumento da temperatura e acidificação dos oceanos, têm sido observadas. Com base na hipótese de que as mudanças climáticas provocam alterações na diversidade microbiana associada à decomposição da matéria orgânica em sedimentos de manguezais, estimulando a liberação de Gases do Efeito Estufa (GEE), o presente estudo teve como objetivo avaliar a dinâmica da diversidade microbiana sob alteração das condições climáticas durante o processo de decomposição, correlacionando-a com a emissão de GEE. Microcosmos destrutivos contendo material orgânico proveniente das principais espécies vegetais encontradas nos manguezais do Estado de São Paulo (*Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* e *Avicennia schaueriana*) foram incubados em condições simulando as mudanças climáticas (aumento de temperatura e pH). Amostras do material em decomposição (para sequenciamento da região 16S rRNA e quantificação do gene *mcrA*) e de gases foram coletadas durante 45 dias. As variações no tempo resultaram em impactos significativos no aumento da α diversidade e na composição da comunidade, inicialmente com maior abundância de Gammaproteobacteria para todas as espécies vegetais independente das variações nas condições climáticas. Análises do tipo PCoA evidenciaram o processo de sucessão em decorrência do tempo na β diversidade, indicando o aumento da incidência de Deltaproteobacteria ao final do processo. As emissões de GEE variaram em função da fonte de material orgânico e observou-se relação entre a emissão de metano (CH_4) e a presença do gene *mcrA* em duas das espécies vegetais estudadas, admitindo-se que o aumento na população de Deltaproteobacteria tenha controlado sua emissão. Apesar da quantidade de estudos relacionados à decomposição de matéria orgânica, à diversidade microbiana e à emissão de gases em manguezais, poucos apresentam uma abordagem como a proposta pelo presente trabalho, que busca compreender melhor a relação entre os três processos, relacionando-os a um quarto evento, as alterações climáticas, que são um problema imanente da atualidade.

Palavras-chave: Manguezais; Decomposição; Mudanças climáticas; Gases do efeito estufa; Comunidade bacteriana

ABSTRACT

Climate change effect in organic matter decay and ecological succession in mangroves

Mangrove are coastal environments that provide resources for adjacent ecosystems due to its high productivity that comes from decay of organic matter and carbon cycling, made by microbial communities in sediments. Since the increase of gas release due to fossil fuel burning in the 1970's, many abnormalities have been observed such as temperature and acidification increase. Based on the hypothesis that climate change modifies microbial diversity associated to decay of organic matter in mangrove sediments, changing the emission of Greenhouse Gases (GHG) rate, the goal of this research is to evaluate the dynamics of microbial diversity under the climate change conditions during the decay process, correlating with the emission of GHG. Destructive microcosms containing organic matter from the main plant species found in mangroves throughout the State of São Paulo, Brazil (*Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* e *Avicennia schaueriana*) were incubated simulating climate changes (increase in temperature and pH). Sampling of decaying material (for sequencing of 16S rRNA region and quantification of the *mcrA* gene) and of gasses were collected for 45 days. The variation in time resulted in important increases of α diversity impacts and in the community composition, initially with greater abundance of Gammaproteobacteria for all plant species despite of the climate conditions variations. The PCoA analysis bespeak the chronological sequence in β diversity, indicating the increase of Deltaproteobacteria at the end of the process. The GHG emission varied in function of the organic matter source and the relation between methane (CH_4) release and the presence of the *mcrA* gene in two of the plant species studied, if the increase in the Deltaproteobacteria population controlled its emission. Despite the great number of studies about the decay of organic matter and emission of gases in mangroves, few present an approach like this work, which aims to understand the relation between these three processes and the climate changes, a pressing problem nowadays.

Keywords: Mangrove; Decay; Climate change; Greenhouse gasses; Bacterial communities

1. INTRODUÇÃO

Os manguezais consistem em ecossistemas costeiros situados na faixa tropical e subtropical, na região de transição entre o continente e o mar. São conhecidos por serem altamente produtivos, uma vez que as condições às quais são impostos, tais como alta salinidade, inundações constantes decorrentes da flutuação da maré (levando à anaerobiose) e constante aporte de serapilheira, resultam no processo permanente de decomposição de matéria orgânica (Giri et al. 2011; Alongi, 2002; Kristensen et al. 2008).

O ecossistema é altamente eficiente no sequestro de carbono, principalmente pelos sedimentos, que abrigam diversas comunidades microbianas, responsáveis pela transformação da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes (Reef et al. 2010; Holguin et al. 2001). O tempo de permanência do substrato no ecossistema, aliado às condições de anaerobiose, fazem com que o processo de decomposição ocorra de modo constante e lento, envolvendo variados processos biogeoquímicos que conduzem a ciclagem de nutrientes.

As florestas de mangue encontradas no Estado de São Paulo são constituídas por três espécies vegetais (*Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* e *Avicennia schaueriana*), que variam em termos de composição química e alteram a dinâmica do processo de decomposição (Cunha-Lignon et al. 2009; Robertson, 1988).

Os fluxos de emissão de gases do efeito estufa, processo mediado por microrganismos, associado à decomposição de matéria orgânica, desnitrificação e metanogênese, são pouco caracterizados e entendidos no ecossistema manguezal, embora o número crescente de estudos relacionados ao processo (Chen et al. 2010; Holguin et al. 2001).

A serapilheira é usada para medir a produção do mangue e traçar padrões de produção e quantidade de matéria orgânica potencialmente disponível para decomposição e exportação (Alongi, 2002). Contudo, a falta de protocolos globais referentes à emissão de gases em manguezais dificulta a execução de um balanço de carbono, relacionando a quantidade emitida e a proporção que se mantém no sumidouro, para poder compreender seu peso no contexto global (Allen et al. 2007; Klein et al. 2014).

As crescentes alterações nos sistemas naturais provocadas pelo aumento da liberação de gases, que acentuam o efeito estufa (IPCC, 2014a), são responsáveis por desencadear respostas atípicas em variados ecossistemas.

Diversos trabalhos descritos na literatura buscam explicar a estrutura da comunidade em manguezais para grupos específicos ou em função da profundidade, sucessão ao longo do transepto da floresta, alterações ao longo do tempo e provocadas pelas mudanças sazonais das

condições abióticas (Taketani et al. 2010; Dias et al. 2010, 2012a; Mendes et al. 2012; Ahila et al. 2013; Jing et al. 2016; Varon-Lopez et al. 2013 Mendes et al. 2014; Liu et al. 2015; Basak et al. 2015, 2016; Rocha et al. 2016; Chen et al. 2016; Wu et al. 2016; Bai et al. 2017; Rigonato et al. 2017). No entanto, há poucos trabalhos que associam o efeito de alterações climáticas na comunidade microbiana em manguezais e o seu efeito no processo de decomposição e emissão de gases.

Partindo dessas considerações, este estudo, conduzido utilizando uma abordagem molecular, propõe entender o comportamento das comunidades bacterianas responsáveis pelo processo de decomposição de matéria orgânica frente ao cenário global de mudanças climáticas, e como processos relacionados são afetados dentro do ecossistema manguezal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Manguezais e sua Importância Ecológica

O termo mangue é usado para designar um grupo de espécies de árvores e arbustos tropicais que apesar de pertencerem a famílias diferentes, compartilham características fisiológicas e adaptações especiais, que lhes permitem sobreviver em ambientes com condições específicas. A palavra é também utilizada para referir-se ao “ecossistema mangue”, conhecido também por manguezal ou floresta de mangue (FAO, 2007; Schaeffer-Novelli et al. 2000).

Os manguezais são ecossistemas costeiros que se situam na faixa tropical e subtropical entre as latitudes 25°N e 30°S, tendo sua distribuição delimitada principalmente pelas correntes oceânicas e pela temperatura média mínima de 20°C (Duke et al. 1998; Valiela et al. 2001). Sua cobertura total ao redor do globo é estimada entre 137.760 - 152.000 km² (**Figura 1**), distribuída em 124 países, havendo no entanto uma concentração de aproximadamente 75% em apenas 15 países. (Giri et al. 2011; Webber et al. 2016).

Figura 1. Distribuição das florestas de mangue e riqueza de espécies ao redor do mundo.

Fonte: Polidoro et al. 2010.

O Brasil é o terceiro país com maior extensão de florestas de mangue, possuindo 7% da cobertura total, distribuída ao longo da costa desde o limite com a Guiana Francesa, no Estado do Amapá (04°30'N), até Santa Catarina (28°30'S), perfazendo uma área total de aproximadamente 13.800 - 9.626 km² (Giri et al. 2011; Ferreira & Lacerda, 2016; Schaeffer-Novelli et al. 2000; Magris & Barreto, 2010).

Dada a ampla distribuição do ecossistema no território nacional, Schaeffer-Novelli (1990) propôs a divisão da linha litorânea em oito segmentos com base nas similaridades nas condições ambientais e fisiográficas. Os manguezais localizados no Estado de São Paulo

encontram-se inseridos no Segmento VII -“Cabo Frio - Torres” que apesar de concentrar as florestas mais degradadas, possui áreas bem preservadas, como o Sistema Cananéia-Iguape, por exemplo.

As florestas de mangue se desenvolvem em locais onde ocorre a transição entre ambientes terrestres de água doce e marinhos, geralmente distribuídos na chamada “zona entremarés” ou “intertidal” (Duke et al. 1998). Esta característica resulta na influência constante das marés sobre a distribuição e organização da fauna, flora e processos biogeoquímicos (Thom, 1984; Schaeffer-Novelli et al. 1990).

A formação, distribuição e funcionalidade dos mangues é influenciada por uma série de fatores que podem ser classificados como globais e regionais. A nível global a temperatura tem-se apresentado como o fator determinante para a incidência desse ecossistema ao redor do globo terrestre em diferentes escalas de tempo. Por outro lado, a nível regional, a área e biomassa de uma floresta de mangue variam em função da precipitação, ondas, marés e presença de corpos d’água, como rios e lagoas. (Duke et al. 1998; Alongi, 2002; Thom, 1984). Os fatores regionais afetam de modo direto a circulação da água por meio da geração de turbulência, advecção e aprisionamento de águas costeiras, influenciando na taxa de erosão e deposição de sedimentos (Duke et al. 1998).

Em função de sua localização, a qual é de extrema importância, principalmente biogeoquimicamente, os mangues são ecossistemas altamente produtivos devido ao acúmulo de substâncias autóctones, provenientes basicamente da queda e decomposição do material vegetal da flora local, e de substâncias alóctones carregadas pelas marés. Essa alta produção de matéria orgânica é fundamental nos processos de reciclagem de nutrientes, que influencia a rica cadeia alimentar presente nos manguezais (Valiela et al. 2001; Vergara-Filho, 1993; Araújo et al. 1979).

Entretanto, apesar da elevada taxa de fixação e armazenamento de carbono em forma de biomassa vegetal, a maior parte dos nutrientes não é aproveitada, sendo enviada para o mar e outros sistemas adjacentes ou enterrada nos sedimentos (Holguin et al. 2001), atribuindo ao ecossistema um papel importante na manutenção da qualidade da água e estabilidade da costa (Twilley et al. 1996).

Em razão da fixação de carbono por parte da vegetação e pelo fluxo de matéria orgânica dissolvida (MOD) e particulada dentro das florestas de mangue e nos sistemas adjacentes, diversas teias alimentares são estimuladas e fazem com que os manguezais funcionem como viveiros para organismos de diversas espécies (Alongi, 2002).

A abundância e diversidade da infauna (composta basicamente por anelídeos e

tanaidacea), epifauna (em sua maioria organismos da classe hydrozoa) e meiofauna (anelídeos e alguns crustáceos) é relativamente baixa quando comparada à de outras florestas tropicais, fator que pode estar relacionado com as condições físicas do ecossistema, como os ciclos constantes de inundação, devido à ação da maré e elevado nível de salinidade, por exemplo (Kathiresan & Bingham, 2001).

Dentro dos organismos característicos deste ambiente podem ser citados os camarões e caranguejos, onde os últimos, além de possuírem valor econômico, participam de processos importantes como a decomposição do material orgânico (Alongi, 2009; Kristensen et al. 2008). Diversas espécies de aves e peixes compõem parte da biota associada, dado que utilizam os mangues apenas em um período de seus ciclos de vida (Alongi, 2002).

As florestas de mangue possuem um alto nível de estabilidade ecológica graças ao dinamismo resultante da persistência e resiliência do ecossistema, características que acabam por lhe atribuir uma série de funções, tais como a de barreira mecânica contra a ação erosiva das ondas e marés, e consequente proteção da linha costeira; retenção e acúmulo de sedimentos, nutrientes e outros elementos, incluindo contaminantes, como metais pesados (Alongi, 2007, 2009).

Devido à grande riqueza de recursos naturais, os manguezais tem sido tradicional e comercialmente utilizados pela população humana ao redor do globo. Comunidades locais de áreas com presença desse tipo de ecossistema o tem utilizado como provedor de fontes de alimento, energia e como matéria prima para confecção de diversos artefatos ao longo dos tempos (Kathiresan & Bingham, 2001). Contudo, nas últimas décadas, a exploração contínua desses recursos, principalmente em função da aquicultura, desmatamento, expansão urbana e poluição, tem contribuído para a degradação e perda do ecossistema (Saenger, 1983; Alongi, 2002; Duke et al. 2007).

Em todos os continentes, a área atual de florestas de mangue é substancialmente menor do que a original, estimando-se uma perda de aproximadamente 35% nas últimas décadas, com um promédio de 2,1% ao ano desde meados de 1980 (Valiela et al. 2001).

2.2. Vegetação

Os mangues constituem florestas simples e com poucos níveis de espécies quando comparados com outras florestas tropicais. Apenas poucas famílias de plantas (como por exemplo, Rhizophoraceae, Avicenniaceae e Combretaceae) têm desenvolvido adaptações

fisiológicas e estruturais para as condições árduas em que os manguezais se desenvolvem (FAO, 2007; Alongi, 2002). O número exato de espécies é ainda discutido, variando de acordo com o tipo de classificação utilizado, no entanto, acredita-se que existam em torno de 70 a 73, com a maior diversidade de espécies localizada na Ásia e África (Figura 1) (Polidoro et al. 2010; Webber et al. 2016; FAO, 2007).

De acordo com Tomlinson (1986), há três tipos de mangue: espécies maiores de mangue, espécies menores e mangues associados. As espécies menores constituem elementos menos visíveis da vegetação e raramente formam populações. Por outro lado, as espécies maiores, “rígidas” ou “mangues verdadeiros” possuem uma série de características, enumeradas a seguir: *a.* ocorrem exclusivamente em manguezais; *b.* possuem um papel importante na estrutura da comunidade; *c.* têm especializações morfológicas (especialmente raízes aéreas e mecanismos especializados de troca de gases); *d.* possuem mecanismos morfológicos para exclusão ou excreção de sal, e, *e.* têm isolamento taxonômico dos parentes terrestres.

A baixa diversidade genética reflete as difíceis condições ambientais de crescimento encontradas na zona intertidal, onde aparentemente há menos oportunidades de diversificação, e a variabilidade resulta das respostas fenotípicas às condições ambientais. (Duke et al. 1998; Kathiresan & Bingham, 2001).

Quando se analisa uma floresta de mangue, deve-se considerar o regime hidrológico da costa, dado que a fonte de energia do ambiente determina as características do ecossistema em termos de distribuição das espécies e forma (Cunha-Lignon et al. 2011). Os mangues se desenvolvem melhor em locais com baixa energia de marés, acima do nível do mar, onde há maior depósito de partículas finas e nutrientes, o que permite o estabelecimento das raízes (Alongi, 2002; Duke et al. 1998).

Fora a influência das marés, a temperatura é um fator limitante para o desenvolvimento de mangues, sendo inclusive determinante para sua incidência em áreas tropicais e subtropicais, visto que as espécies vegetais apresentam pouca tolerância para baixas temperaturas (Duke et al. 1998).

Ainda segundo o autor, outro fator determinante ao desenvolvimento e distribuição das espécies vegetais que compõem uma floresta de mangue é a tolerância à salinidade, uma vez que a maioria das espécies cresce melhor quando esta se encontra em níveis menores, e, quanto maior a tolerância, mais lenta é a taxa de crescimento, além de influenciar o uso de água pela planta (em que aquelas que apresentam maior tolerância conservam mais água).

A plasticidade de uma espécie refere-se à sua capacidade de interagir e se adaptar ao

ambiente em que se desenvolve (Cunha-Lignon et al. 2011), assim, diz-se que os mangues são espécies com grande plasticidade, pois apesar das difíceis condições encontradas na zona entremarés, principalmente no que diz respeito às constantes inundações e elevados níveis de salinidade, possuem um conjunto de adaptações e atributos que promovem a sua sobrevivência. É importante ressaltar que os atributos são encontrados em diferentes níveis nas diferentes espécies e estão associados com as condições ambientais de cada floresta (Kathiresan & Bingham, 2001).

A adaptação mais visível desenvolvida em função do regime de marés é o sistema de raízes aéreas, o qual se encontra completamente ou em grande parte exposto à atmosfera por um curto período do dia, e coberto por água durante a maré alta. Suas principais funções são a troca de gases, ancoragem das árvores nos sedimentos lamacentos e absorção de nutrientes. No entanto, apenas as espécies mais especializadas, os “mangues verdadeiros”, têm desenvolvido esse sistema radicular, o qual pode variar na presença de estruturas de acordo com a espécie, como os pneumatóforos, por exemplo, presentes nos gêneros *Avicennia*, *Sonneratia* e *Laguncularia*, conformações responsáveis pela troca de gases nos sedimentos anaeróbios durante as vazantes da maré (Tomlinson, 1986; FAO, 2007).

Os mangues são fisiologicamente tolerantes a elevados níveis de sal e possuem mecanismos para obter “água fresca” apesar do forte potencial osmótico dos sedimentos. Exclusão, excreção e acúmulo de sal fazem parte dos métodos desenvolvidos e variam de acordo com a espécie (Ball et al. 1997). Indivíduos do gênero *Rhizophora*, por exemplo, realizam a exclusão do sal absorvido a nível de raiz. Espécies dos gêneros *Avicennia*, *Aegiceras* e *Aegialitis* removem o excesso de sal a nível foliar, por meio de glândulas de excreção ou por transpiração cuticular, e espécies de *Lumnitzera* e *Excoecaria* realizam o processo de dessalinização por meio do acúmulo de sal nos tecidos das folhas, que acabam caindo (Tomlinson, 1986; Kathiresan & Bingham, 2001).

Além desses mecanismos, a maioria das espécies acumula e/ou sintetiza outros solutos para regular e manter o balanço osmótico. Para facilitar o fluxo de água das raízes para as folhas, o potencial de água das folhas é menor (-2.5 a -6 MPa) que o das raízes (Kathiresan & Bingham, 2001).

Os métodos de reprodução dos mangues também fazem parte das adaptações desenvolvidas a fim de aumentar o sucesso de propagação, podendo ocorrer por quatro vias diferentes, viviparidade, cripto-viviparidade, germinação no solo ou propagação vegetativa (Kathiresan & Bingham, 2001).

Na família Rhizophoraceae, os frutos (que contêm as sementes) não são liberados. As

sementes germinam dentro dos frutos ainda fixos na árvore paternal, sendo denominados propágulo (viviparidade). Outras espécies dos gêneros *Aegiceras*, *Avicennia* e *Nypa*, desenvolveram o mecanismo de cripto-viviparidade, onde o embrião emerge a partir da semente, mas não a partir do fruto (Alves, 2001; Kathiresan & Bingham, 2001; FAO, 2007).

Caracterizados por armazenarem reservas nutritivas e possuírem características de flutuabilidade, impermeabilidade e resistência à salinidade, os propágulos funcionam como mecanismos de dispersão (Duke et al., 1998). Essas estruturas são capazes de permanecerem viáveis na água durante vários meses, conservando a capacidade de germinação quando entram em contato com o sedimento. Sua dispersão depende de sua flutuabilidade, longevidade e da atividade das marés e correntes marinhas (Kathiresan & Bingham, 2001).

Na América do Sul, continente que concentra 11% da cobertura mundial de floresta de mangue, são encontradas espécies dos gêneros *Acrostichum*, *Avicennia*, *Conocarpus*, *Laguncularia*, *Pelliciera* e *Rhizophora*, sendo que a espécie *Rhizophora mangle* é a única encontrada em todos os países da região que contém este tipo de formação. No Brasil, há registro de incidência de sete espécies: *Avicennia germinans*, *Avicennia schaueriana*, *Conocarpus erectus*, *Laguncularia racemosa*, *Rhizophora harrisonii*, *Rhizophora mangle* e *Rhizophora racemosa*.

2.3. Solos

Os sedimentos transportados pelas marés e corpos de água doce perdem velocidade quando ocorre o encontro de ambas as fontes na região dos estuários. Consequentemente, por meio de processos físico-químicos, ocorre a formação de grumos, implicando no aumento do peso das partículas que decantam e originam um sedimento fino composto de areia, silte e argila em diferentes frações e rico em matéria orgânica (Alves, 2001; Lustrum & Chen, 2014).

Os solos dos manguezais possuem uma coloração característica, cinza escuro, e um forte odor devido à presença de sulfeto de hidrogênio produzido pelas bactérias redutoras de enxofre (Hossain & Nuruddin, 2015). A porção superficial dos solos formada por diferentes tipos de areia e argila é caracterizada pela presença de poros que facilitam a percolação da água e aeração dos sedimentos durante a vazante da maré. Em contrapartida, os solos abaixo da camada superficial são encharcados e apresentam uma baixa taxa de aeração (que diminui com a profundidade), portanto anaeróbios, e alto conteúdo de matéria orgânica (Holguin et al.

2001).

As características dos solos de mangue são determinadas por um conjunto de fatores físicos, químicos e biológicos que variam de acordo com a localização específica de cada floresta (Hossain & Nuruddin, 2015). A disponibilidade de nutrientes para as diversas espécies vegetais é geralmente baixa, sendo influenciada por uma série de condições bióticas e abióticas, tais como altitude, regime de marés, tipo de solo e seu potencial redox, conteúdo de matéria orgânica, atividade microbiana, produção de serapilheira e decomposição (Reef et al. 2010; Naidoo, 2016).

Os atributos do solo, como a salinidade, concentrações de sulfeto de ferro, potencial redox, nutrientes, matéria orgânica e posição fisiográfica são determinantes para a composição e estruturação da vegetação, influenciando diretamente nos níveis de produtividade e densidade das florestas (Hossain & Nuruddin, 2015).

O potencial Hidrogeniônico (pH) dos sedimentos é bastante variado, podendo atribuir características de acidez ou alcalinidade aos solos. De acordo com levantamento feito por Hossain & Nuruddin (2015), alguns estudos descrevem valores de pH na faixa de 2,87 a 6,40, enquanto outros reportam medidas entre 7,4 a 8,22. No entanto, geralmente os solos desse ecossistema são descritos como tipicamente ácidos (Reef et al. 2010). O pH atua sobre a solubilidade de íons, influenciando na disponibilidade de elementos essenciais, como o fósforo, da mesma forma que em elementos não essenciais, como o alumínio (que em concentrações elevadas pode acarretar toxicidade em plantas), atuando na taxa de crescimento das espécies vegetais (Naidoo, 2016; Hossain & Nuruddin, 2015).

O potencial redox (E_h) dos solos do ecossistema manguezal é comumente mensurado abaixo de 100mV, indicando condições anaeróbias devido principalmente ao constante alagamento em função das marés. Essas condições, aliadas ao pH e à idade dos solos (antigos e por conseguinte altamente lixiviados e expostos a erosão), acarretam deficiência de nutrientes (Holguin et al. 2001; Reef et al. 2010).

Devido às condições anaeróbias impostas pelas circunstâncias ambientais, há abundância de bactérias desnitrificantes nos solos dos mangues e consequente aumento nas taxas de desnitrificação, resultando na formação de amônia, que acaba se tornando a forma mais observada de nitrogênio dentro desse ecossistema (Naidoo, 2016; Reef et al. 2010).

O alto nível de carbono alocado nas raízes das plantas, em conjunto com as quantidades elevadas de serapilheira e as condições anóxicas dos solos, implicam velocidade reduzida no processo de decomposição, permitindo o grande acúmulo de matéria orgânica (Twilley et al. 1996; Hossain & Nuruddin, 2015). Segundo Lustrum & Chen (2014), grande

proporção do carbono total do ecossistema pode ser encontrado na matéria orgânica dos solos.

2.4. Mudanças Climáticas

2.4.1. Emissão de gases do Efeito Estufa

O efeito estufa é um processo natural mediado por gases e que depende da energia emitida e absorvida pela Terra. Os “gases do efeito estufa” (GEE), tais como carbono, metano e óxido nitroso (CO_2 , CH_4 e N_2O , respectivamente), interagem com a radiação infravermelha. Ao absorverem a energia proveniente da radiação, as moléculas dos gases se movimentam e colidem entre si, aumentando a temperatura pela liberação de energia em forma de calor. Estima-se que aproximadamente 48% da radiação é refletida, e da parcela remanescente, 5% equivalem ao calor sensível e 25% retornam em forma de vapor. Esse processo e o balanço energético ocorrem na troposfera e são responsáveis por manter a temperatura da Terra, proporcionando condições favoráveis à vida (IPCC, 2013).

Com o aumento da emissão de GEE desde a década de 1970, tem sido registrado um aumento da temperatura terrestre, uma vez que o aumento na quantidade desses gases aumenta o tempo de retenção de calor na atmosfera, desencadeando, conseqüentemente, uma série de anomalias em diversos sistemas naturais (IPCC, 2014a).

Os manguezais, localizados em regiões tropicais e subtropicais, têm sido reconhecidos como um dos principais contribuintes da emissão de GEE na área litorânea. Embora os fluxos de emissão de N_2O e CH_4 sejam pouco caracterizados dentro do ecossistema, as condições ambientais são favoráveis aos processos de desnitrificação e metanogênese (Chen et al. 2010), e processos mediados por microrganismos, tal como a redução anaeróbia do sulfato, contribuem com aproximadamente 100% das emissões de CO_2 dos sedimentos (Holguin et al. 2001).

Apesar de diversos estudos documentarem a emissão de GEE em manguezais, relacionando-os à vegetação, distribuição espacial e mudanças sazonais, pouco se sabe das implicações ecológicas que as mudanças climáticas podem exercer nos ciclos biogeoquímicos e conseqüentemente nos fluxos de emissão de gases (Chen et al. 2012; Purvaja et al. 2004; Allen et al. 2011).

A temperatura representa papel fundamental no estímulo da atividade metabólica microbiana, e seu aumento pode influenciar positivamente no aumento da atividade, provocando um aumento da respiração do solo. Da mesma forma, o pH desempenha função reguladora da taxa metabólica e pode agir sobre a atividade microbiana, calculada pelo

feedback da emissão de gases (Oertel, 2016). Nesse sentido, e frente ao cenário imposto pelas mudanças climáticas, mostra-se necessário estabelecer uma relação entre o impacto dessas alterações e a microbiota associada aos fluxos de GEE em manguezais.

2.4.2. Acidificação e aumento da temperatura das águas oceânicas

Desde a década de 1970, as emissões de gases provenientes da queima de combustíveis fósseis triplicaram as emissões de gás carbônico (CO_2), o que representa um aumento de quase 40% da liberação deste gás na atmosfera terrestre. Como consequência, diversas anormalidades em sistemas naturais têm sido observadas, tais como o aumento da temperatura da superfície terrestre, aumento do nível dos oceanos e sua acidificação. Diversos estudos apontam que houve um aumento da temperatura da superfície marinha em torno de $0,11^\circ\text{C}$ por década no período de 1960-2010, nos primeiros 75m de profundidade, diminuindo para $0,015^\circ\text{C}$ em regiões localizadas a 700m (IPCC, 2014a).

Os oceanos conseguem armazenar grandes quantidades de CO_2 , representando o maior reservatório de carbono inorgânico do planeta, com uma capacidade aproximadamente 50 vezes maior de armazenamento do que a atmosfera. Portanto, pequenas alterações nos reservatórios do oceano podem provocar grandes alterações nas concentrações atmosféricas de CO_2 . Desse modo, os oceanos apresentam-se como importantes sumidouros de carbono, chegando a absorver em torno de 30% das emissões de carbono de origem antropogênica (IPCC, 2013).

A absorção de CO_2 pelos oceanos muda o equilíbrio químico da água marinha através do equilíbrio termodinâmico do CO_2 com a água. O CO_2 que é absorvido dissolve e forma ácido carbônico (H_2CO_3), considerado um ácido fraco. Com o aumento de CO_2 na água, há uma diminuição no estado de saturação dos íons de carbonato (CO_3^{2-}) e de carbonato de cálcio (CaCO_3), enquanto ocorre um aumento do íon bicarbonato (HCO_3^-). O aquecimento das águas oceânicas reduz a solubilidade de CO_2 na água, diminuindo consequentemente a quantidade de gás carbônico que poderia ser absorvida e que acaba permanecendo na atmosfera. Por conseguinte, a solubilidade do oxigênio também diminui, efeito que tem por consequência a formação de zonas anóxicas (IPCC, 2013).

O aumento da temperatura da superfície oceânica (0 a 100m) não afeta apenas a absorção de CO_2 , como estimula o processo de diminuição do pH, conhecido como acidificação oceânica. O íon bicarbonato formado durante o processo de absorção de CO_2 é

convertido em carbonato em águas mais quentes, liberando o íon de hidrogênio (H^+), que causa a redução do pH. A média de pH em escala total da superfície oceânica varia entre 7,8 a 8,4, valor que atribui a característica de pH básico às águas oceânicas, contudo, estudos apontam que desde o início da era industrial houve uma diminuição de 0,1 unidades de pH, o que corresponde a um aumento de 26% na concentração do íon H^+ (IPCC, 2013).

Projeções drásticas estimam que até o final do século a temperatura da superfície oceânica deve aumentar em média 2°C, enquanto pode-se esperar uma redução de 0,31 unidades de pH, o equivalente a 100-109% na acidez total. Esses valores podem apresentar variações a depender da região hemisférica, e acredita-se que o impacto em sistemas costeiros possa ser maior devido à proximidade de centros urbanos e exposição a mais riscos de degradação (IPCC, 2014a).

2.4.3. Efeito das Mudanças Climáticas em Manguezais

A ameaça iminente para os manguezais em relação ao aquecimento global é quanto ao aumento do nível do mar, o que acarretaria alterações na composição da comunidade vegetal, levando a um aumento da fotossíntese e respiração, deposição de serapilheira, decomposição microbiana, alteração na diversidade da fauna e da flora, e redução da sedimentação. Frente a esse cenário, a principal preocupação é quanto à perda da diversidade vegetal (Alongi, 2002).

Diversos estudos questionam e apontam para conclusões divergentes no que diz respeito aos impactos desse problema dentro do ecossistema tratando-se da vegetação. Por um lado, uma vertente acredita que outros efeitos provocados pelo aquecimento global (fora o aumento do nível do mar), tais como aumento de temperatura, de precipitação e de concentração de carbono, poderiam estimular a produtividade do ecossistema manguezal, partindo da premissa de que a temperatura é o fator limitante da distribuição do ecossistema ao redor do globo. Dessa maneira, acredita-se que dadas as características de elevada capacidade de armazenar carbono e adaptação a condições naturais adversas, as florestas de mangue seriam mais resilientes e flexíveis do que outros ecossistemas (Twilley et al. 1996; Alongi, 2007; Webber, et al. 2016).

Em contrapartida, diferentes estimativas apontam que as mudanças climáticas podem levar à perda de 10% a 15% das florestas de mangue até 2100. Os mangues localizados nas costas do Atlântico e do Pacífico são os mais ameaçados, com aproximadamente 40% de suas espécies sob ameaça de extinção. Estudos realizados na Guiana Francesa apontam que a

degradação dos manguezais pela atividade humana (conversão de terras, uso agrícola, exploração de camarões e lançamentos de rejeitos), em conjunto com o aumento da temperatura e acidificação das águas, provocadas pelas mudanças climáticas, podem levar a um futuro colapso do ecossistema, que seria agravado pelo aumento do nível do mar (estimado em 6m), seguido de um recuo de 90m da margem da praia, podendo implicar na inundação e desaparecimento de milhares de hectares de floresta de mangue (IPCC, 2014b).

Admite-se então que as florestas de mangue distribuídas pelo globo não seriam afetadas da mesma forma. Dependendo da idade do manguezal, latitude, entre outras características, algumas florestas poderiam se adaptar e resistir às mudanças climáticas, havendo desse modo respostas específicas para cada floresta de mangue e espécie vegetal (Naidoo, 2016).

Independente das controvérsias, sabe-se que a devastação das florestas de mangue implicaria em um impacto considerável no balanço global de carbono, uma vez que o ecossistema fixa e armazena uma quantidade significativa deste elemento (Alongi, 2002). E, apesar do amplo número de estudos visando compreender o comportamento do ecossistema frente às mudanças climáticas, há uma carência de estudos com abordagem sobre o impacto que essas alterações podem ter e ocasionar a nível microbiológico.

2.5. Microbiologia dos Manguezais

A atividade microbiana é responsável pela maior parte da transformação dos nutrientes em manguezais e aproximadamente 91% da biomassa microbiana é composta por bactérias e fungos. As bactérias são responsáveis pela maior parte do fluxo de carbono nos sedimentos do ecossistema, processando também a maior parte dos nutrientes e fluxos de energia, atribuindo às florestas de mangue as características de “sumidouro de carbono” (Holguin et al. 2001).

O ecossistema proporciona um ambiente propício para o desenvolvimento de diversas comunidades bacterianas que são essenciais no controle e equilíbrio das condições físicas e químicas do ecossistema, estando envolvidas nos ciclos biogeoquímicos do carbono, enxofre e nitrogênio (Holguin et al. 2001; Kathiresan & Bingham, 2001).

Os principais grupos encontrados em manguezais são englobados pelo filo Proteobacteria, majoritariamente conformado por espécies das classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Deltaproteobacteria (Dias et al. 2010; Andreote et al. 2012; Mendes et al. 2014).

Entre as espécies descritas e associadas aos diversos ciclos, estão: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Klebsiella* sp., associadas à fixação de nitrogênio; *Chloronema*, *Chromatium*, *Beggiatoa*, *Thiopedia*, *Leucothiobacteria* sp., fotossintéticas anoxigênicas; *Methanocoides* sp., correspondendo ao grupo das bactérias metanogênicas; *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Xanthobacter*, *Vibrio proteolyticus*, *Enterobacter*, *Kluyvera*, *Chryseomonas* e *Pseudomonas* sp., bactérias solubilizadoras de fosfato e *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfosarcina*, *Desulfococcus* sp., responsáveis pela redução do sulfato (Thatoi et al. 2013; Kathiresan&Bingham, 2001).

A redução de sulfato é considerada um dos processos mais importantes em ambientes anaeróbios (tais como as florestas de mangue) uma vez que corresponde ao estágio final da decomposição sob tais condições. O processo é realizado pelas chamadas bactérias redutoras de sulfato (BRS), que, em condições de anaerobiose, utilizam os íons de sulfato como aceptores finais de elétrons, produzindo ácido sulfídrico (H_2S) e sendo responsáveis por aproximadamente 53% da degradação de matéria orgânica dentro do ecossistema (Holguin et al. 2001).

Em adição à comunidade bacteriana, grupos do domínio Archaea, como Methanosaetaceae e Methanomicrobiaceae, têm sido relatados como importantes conformadores da estrutura microbiana, principalmente por estarem associados à metanogênese em manguezais (Taketani et al. 2010; Mendes et al. 2012; Zhou et al. 2014).

Todas as arqueias metanogênicas expressam a coenzima M metil redutase (MCR), a qual catalisa a etapa final na produção de metano e sua presença é utilizada para indicar o processo de metanogênese em diversos ambientes, uma vez que todos os genomas de arqueias metanogênicas codificam ao menos uma cópia do operon *mcrA*. Alguns grupos de *mcrA* têm o potencial de catalisar a etapa final do processo metabólico de metanogênese, contudo, outros grupos provocam alterações geométricas nos grupos metil e, consequentemente, na função proteica. Dessa forma, algumas arqueias metanogênicas são capazes de produzir e simultaneamente oxidar metano em baixos níveis sob condições anaeróbias (Hallam, 2004).

As diversas comunidades presentes nos sedimentos dos manguezais se adaptam constantemente às variações ambientais que ocorrem dentro do ecossistema, tais como as alterações na temperatura nas diferentes épocas do ano e salinidade, além de as constantes inundações da maré. Contudo, a abundante e constante renovação de substrato permite o crescimento e coexistência de diversos microrganismos (Thatoi et al. 2013; Holguin et al. 2006).

2.5.1. Métodos moleculares para estudo das comunidades microbianas

Embora seja possível acessar informações de diversidade, composição de comunidades microbianas e determinar características de grupos específicos utilizando abordagens clássicas dependentes de cultivo, tem ocorrido um aumento de estudos empregando diversos métodos moleculares, tais como *fingerprinting*, construção de bibliotecas de clones, sequenciamento em larga escala e análises de metagenoma, principalmente devido à limitação das técnicas dependentes de cultivo (Rastogi et al. 2011).

As abordagens moleculares permitem obter dados de alta qualidade de modo rápido, permitindo correlacionar, por exemplo, informações de caráter taxonômico com dados metabólicos e de diversidade de diversos domínios, como Bacteria, Archaea e Eukarya (Sinclair, 2016).

Análises metagenômicas representam um método de avaliar o potencial das vias metabólicas em ambientes como os manguezais de forma rápida, onde o DNA presente no ambiente pode ser sequenciado e promover uma ampla visão da comunidade microbiana em termos tanto de taxonomia como funcional (Andreote et al. 2012).

Em paralelo, há a possibilidade de trabalhar com grupos específicos, por exemplo, através da identificação de genes exclusivos, utilizados como marcadores, permitindo acessar informações quantitativas ou compreender vias metabólicas específicas (Friedrich, 2005).

Por permitirem compreender melhor o funcionamento de metabolismos, comportamentos de comunidades e o estabelecimento de relações entre diversas variáveis (sejam bióticas ou abióticas, qualitativas ou quantitativas e temporais), as técnicas moleculares aplicadas aos estudos de ecologia microbiana representam a possibilidade de entender a conformação de diversos ambientes (Rastogi et al. 2011).

2.6. Sucessão Ecológica

Os sistemas biológicos são dinâmicos em uma ou mais escalas. O termo “dinâmica” refere-se especificamente à mudança sobre o tempo, e mudanças temporais nas comunidades microbianas resultam no crescimento e morte celular, assim como a introdução ou saída de grupos de organismos na comunidade (Fuhrman et al. 2015).

O avanço das técnicas moleculares, que permitem acessar uma alta quantidade de informações sobre a diversidade microbiana, e alterações na comunidade que não podiam ser

entendidas utilizando-se técnicas dependentes de cultivo devido à velocidade de mudança dos grupos taxonômicos, têm possibilitado traçar padrões de sucessão e melhor compreensão de diversos ambientes (Fierer et al. 2010).

Estudos relacionados à sucessão e associados a técnicas moleculares têm possibilitado entender variações nas comunidades microbianas promovidas por alterações nas condições ambientais, permitindo compreender, por exemplo, o tipo de processos (determinísticos e/ou estocásticos) que moldam a diversidade e comunidades de um determinado ecossistema (Andreote et al. 2014; Rigonato et al. 2017).

A avaliação da sucessão ecológica durante o processo de decomposição permite assim analisar a dinâmica das comunidades relacionadas e entender a sua relação com fatores abióticos e outros processos adjacentes.

2.7. Decomposição de Matéria Orgânica e o Aporte de Carbono Global

O processo de decomposição de matéria orgânica em manguezais pode ser compreendido como um sistema dividido em três etapas:

1. A lixiviação dos componentes químicos;
2. O condicionamento dos detritos pelos microrganismos;
3. A fragmentação por invertebrados aquáticos e/ou por fatores ambientais físicos, que ocorrem simultaneamente e interagem durante todo o processo.

Esse sistema é guiado por três variáveis, que são: biológicas, a caracterização da serapilheira e o ambiente. A primeira variável refere-se à estrutura da comunidade de decompositores (invertebrados e microrganismos), onde maior abundância e biomassa resultam em melhor decomposição. A segunda, a caracterização da serapilheira, determina a palatabilidade, onde menos dureza, concentração de compostos secundários e maior concentração de nutrientes podem influenciar na maior perda de massa. A terceira variável é associada às condições físicas e químicas do ambiente, porque maiores temperaturas, boa condutividade elétrica e concentração de nutrientes podem contribuir positivamente para a decomposição. Especialmente em manguezais, deve-se considerar o efeito da salinidade, que é uma variável chave para a decomposição (Gessner et al. 1999).

A velocidade do processo de decomposição também varia em função de diversos fatores, como a procedência de origem, local de precipitação, idade e natureza do material vegetal (e.g. folhas, galhos, etc.) (Kristensen et al. 2008).

Desse modo, em um primeiro momento, o processo de decomposição é geralmente estimulado por caranguejos, que incitam processos microbianos de decomposição de matéria orgânica. As folhas, por eles trituradas, geram detritos e aumentam a superfície de contato, além de o aporte de fezes com nutrientes facilmente disponíveis (Alongi, 2002; 2009; Kristensen et al. 2008). Em seguida, inicia-se o processo de decomposição microbiana, que apesar de ter participação fúngica (associada principalmente à síntese de enzimas envolvidas no processo de degradação da lignina), é majoritariamente exercido por diversas comunidades bacterianas (Holguin et al. 2001).

Complementar à premissa da segunda variável proposta por Gessner (1999), as folhas da maioria das espécies vegetais que compõem as florestas de mangue contêm em torno de 40% de compostos solúveis em água, os quais podem ser convertidos em biomassa bacteriana em menos de oito horas após a sua queda sobre sedimento coberto por água (Jennerjahn et al. 2002).

Os manguezais são ecossistemas altamente eficientes no sequestro de carbono, tanto na forma de biomassa vegetal, e, principalmente, nos sedimentos, havendo inclusive maior armazenamento de nutrientes no solo do que na vegetação (Saenger, 1983; Jennerjahn et al. 2002; Reef et al. 2010).

A eficiência no sequestro de carbono (fixação e armazenamento do elemento), que lhe atribui as características de importante sumidouro de carbono e de sedimentos ricos em compostos orgânicos, pode ser atribuída à alta produtividade e baixa taxa de respiração dos sedimentos, decorrentes das condições ambientais em que o ecossistema se encontra e que geram um ciclo de equilíbrio, uma vez que as teias alimentares são impulsionadas pela fixação de carbono realizada pela vegetação e pelo fluxo de matéria orgânica dissolvida e particulada dentro da floresta (Saenger, 1983; Jennerjahn et al. 2002; Alongi, 2002).

Uma das condições ambientais mais importantes que condicionam o ecossistema é a frequência das inundações, que controla o tempo de permanência do material em decomposição, atribuindo estabilidade ao substrato (Twilley et al. 1996). A atividade e diversidade microbiana associadas à rizosfera também explicam a alta produtividade dos manguezais, mesmo se tratando de ambientes submetidos a “duras” condições ambientais e de difícil crescimento, tendo inclusive produtividade similar ao de florestas tropicais continentais (Alongi, 2009).

Pelo menos 50% da produção primária dos mangues é exportada como matéria orgânica para os oceanos, sendo duas ordens de magnitude maior que a média global dos ecossistemas terrestres (0,7%), e contribui com até 15% do carbono orgânico global acumulado nos sedimentos marinhos. Apesar de as florestas de mangue terem cobertura de 0,1% dos continentes, elas contribuem provavelmente com mais de 10% do carbono orgânico dissolvido globalmente transportado do continente para os oceanos (Dittmar et al. 2006).

3. HIPÓTESE

As projeções propostas para o cenário climático para os próximos anos provocam alterações na diversidade microbiana associada à decomposição da matéria orgânica em sedimentos de manguezais, estimulando a liberação de Gases do Efeito Estufa (GEE).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a dinâmica da diversidade microbiana sob alteração das condições climáticas durante o processo de decomposição de matéria orgânica, correlacionando-a com a emissão de gases do efeito estufa.

4.2. Objetivos Específicos

- Determinar a diversidade de comunidades microbianas em amostras de material vegetal em decomposição encontrado no manguezal por sequenciamento em larga escala de rDNA.
- Demonstrar como condições ambientais alteram a dinâmica de colonização e degradação de material lignocelulósico por incubações em microcosmo.
- Demonstrar a ligação da estrutura da comunidade com a emissão de gases do efeito estufa durante a ciclagem da matéria orgânica vegetal.
- Verificar a abundância do gene *mcrA* (metil coenzima M redutase) e sua relação com a emissão de metano.
- Identificar o efeito da temperatura e acidificação marinha na decomposição da matéria orgânica vegetal.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Descrição da Área de Coleta

O presente estudo foi conduzido utilizando-se sedimentos, água do mar e folhas de três diferentes espécies vegetais (*Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* e *Avicennia schaueriana*) coletados no bosque de mangue da Ilha do Cardoso, localizado entre as coordenadas 25°05'01,8"S – 47°57'45,7"W, no município de Cananéia - São Paulo (**Figura 2**). A área faz parte do Sistema Costeiro Cananéia – Iguape, constituído por três ilhas principais (Ilha do Cardoso, Cananéia e Ilha Comprida), separadas por canais sinuosos (Cunha-Lignon et al. 2009).

O Sistema Cananéia – Iguape encontra-se localizado no extremo sul do Estado de São Paulo, inserido no Segmento VII proposto por Schaeffer-Novelli (1990). Formado por uma larga planície, o sistema se estende por uma área de aproximadamente 2500 km² e é caracterizado por uma estação chuvosa, de janeiro a março (com média mensal de 266,9mm) e uma seca, de julho a agosto (com média mensal de 95,3mm). Apresenta temperatura média anual de 23,6°C, sendo a temperatura média mensal mais alta em fevereiro (27,4°C) e a mais baixa em agosto (20,7°C) (Cunha-Lignon et al. 2011).

A região possui um padrão hidrodinâmico influenciado pela descarga de água doce do Rio Iguape e pelo regime de maré mista, com altura média de 0,81m (Cunha-Lignon et al. 2011; Mesquita & Harari, 1983).

Figura 2. Área de estudo, localizada na Ilha do Cardoso - Cananéia, no litoral sul do Estado de São Paulo, Brasil.

Os manguezais do Sistema são dominados principalmente por três espécies vegetais, sendo elas: *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* e *Avicennia schaueriana* (Schaeffer-Novelli et al. 1990; Cunha-Lignon et al. 2009). Sua distribuição e taxa de desenvolvimento são fortemente influenciadas pelo regime hidrológico, havendo dominância de *R. mangle* bem desenvolvidas ao longo da franja. Os locais com baixa energia de maré, tanto na franja como no bosque de mangue, são dominados por *L. racemosa* e certas áreas por *A. schaueriana* (Cunha-Lignon et al. 2011).

5.2. Construção de Microcosmos para Avaliação da Sucessão Ecológica e Efeito das Mudanças Climáticas durante o Processo de Decomposição de Material Vegetal

A fim de avaliar a sucessão ecológica que ocorre durante o processo de decomposição da matéria orgânica a partir do momento em que esta entra em contato com os sedimentos de manguezal, foram construídos microcosmos destrutivos que consistiram em garrafas plásticas estéreis de 500 mL, às quais foram adicionados 100g de sedimento, 10mL de água do mar e 16 discos (com 1,70cm de diâmetro) de material vegetal, provenientes de folhas de *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* e *Avicennia schaueriana*.

Visando simular as condições atuais do local de coleta e a perturbação das mudanças climáticas, e com o objetivo de verificar os efeitos destas sobre as emissões dos gases do efeito estufa (CO_2 , CH_4 e N_2O), estrutura das comunidades microbianas e as taxas de decomposição da matéria orgânica, aplicaram-se quatro tratamentos, sendo duas temperaturas e dois valores de pH diferentes (T1pH1, T1pH2, T2pH1 e T2pH2).

Os valores de temperatura e pH utilizados para simulação do cenário sobre influência do aquecimento global foram estimados com base nas projeções propostas pelo IPCC (2014a) para o final do século. Dessa maneira, o pH da água foi ajustado com HCl a 1M (Riebesell et al. 2010; Dickson et al. 2007) para os valores 7,05 e 6,74 e os microcosmos foram incubados por um período de 45 dias a 27,5°C e 29,5°C.

As amostragens para análise das taxas de decomposição da matéria orgânica e avaliação da estrutura das comunidades microbianas foram realizadas em intervalos de 3, 7, 15, 30 e 45 dias.

5.3. Determinação da Taxa de Decomposição do Material Orgânico Vegetal

A degradação do material orgânico vegetal foi calculada pela diferença entre a média do peso seco inicial e o peso seco final médio (remanescente) de cada tratamento para cada uma das espécies vegetais. Assim, através da análise do peso remanescente, foi possível calcular a porcentagem de decomposição.

Para obtenção da taxa de decomposição (constante k), foi realizada a amostragem de discos de folhas das três espécies vegetais em cinco tempos (3, 7, 15, 30 e 45 dias). As amostras retiradas dos microcosmos foram enxaguadas com água destilada para remover os sedimentos aderidos e em seguida foram submetidas a secagem em estufa a 45°C por 72h, até alcançarem peso constante.

As taxas de decomposição foram estimadas segundo o modelo exponencial sugerido por Olson (1963):

$$w_t = w_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde,

w_t = peso da matéria remanescente no tempo;

w_0 = peso inicial;

k = constante da taxa de decomposição;

t = tempo

Dada a impossibilidade de calcular w_0 para cada amostragem (considerando-se que o peso úmido seria correspondente ao do material em decomposição e não ao peso inicial dos discos recém coletados), foi considerado o peso inicial de uma média amostral, calculado para cada uma das três espécies vegetais logo após a coleta do material.

A partir dos valores de k , foi possível calcular o tempo requerido para decomposição de metade (50%) do total do material orgânico inicial (tempo de meia vida ou $t_{50\%}$), determinado de acordo com a fórmula:

$$t_{50} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Equação (2)}$$

Com bases nos resultados obtidos, foram geradas curvas exponenciais, as quais foram convertidas em linhas retas através do $\log_{10}$.

5.4. Efeito das Mudanças Climáticas Sobre a Emissão de Gases do Efeito Estufa em Diferentes Fontes de Matéria Orgânica Vegetal

5.4.1. Amostragem de Gases

Com a finalidade de analisar como os diferentes tratamentos nos microcosmos afetam a emissão de gases do efeito estufa, foram realizadas medições do fluxo de CO₂, CH₄ e N₂O.

Amostras de gases foram coletadas diariamente durante os primeiros oito dias e dia sim dia não a partir do nono dia de experimento.

Para as amostragens, uma tampa com abertura regulada para remoção da amostra de ar foi desenvolvida utilizando a tampa da própria garrafa em que foram montados os microcosmos, com o diferencial de ter acoplada uma torneira bico *luer slip* de três vias (Descarpack) e selada com silicone para garantir ausência de vazamento. O ar acumulado no *headspace* (espaço entre a lâmina de água adicionada e a tampa da garrafa) foi removido com seringa de polietileno de 20 mL durante três momentos em um intervalo de 10 minutos (0, 5 e 10 minutos após o fechamento da torneira), a fim de avaliar o fluxo dos gases (**Figura 3**).

Figura 3. Visão da amostragem e da análise de GEE nos microcosmos. Câmaras fechadas com seringas acopladas (a.); cromatógrafo (b.)

As amostras de ar foram transferidas para *vials* de borossilicato de 12 mL previamente evacuados (Soda Glass Vial – Flat Bottomed, LABCO Co., UK). Depois da coleta de gás, as torneiras foram novamente abertas. A temperatura do ar e a pressão atmosférica local nas câmaras incubadoras foram avaliadas durante o momento da amostragem e ao longo de todo o período experimental.

5.4.2. Análise de Gases e Estimativa dos Fluxos

O fluxo dos gases foi determinado simultaneamente por cromatografia em fase gasosa utilizando o cromatógrafo TRACE 1310 (Thermo Scientific) equipado com injetor automático (TriPlus RSH), detector de captura de elétrons (ECD) para determinação do N₂O e detector de Ionização de Chama (FID) para CH₄ e CO₂ (previamente convertido em CH₄ através de um metanador). As amostras foram analisadas na Central Analítica de Gases (CGS) da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP).

O fluxo foi calculado como o incremento/decréscimo linear na concentração dentro de cada microcosmo e após calculado foi corrigido de acordo com a temperatura e a pressão atmosférica do dia, conforme a seguinte equação (Jantalia et al., 2008):

$$f = \frac{\Delta C}{\Delta t} * \frac{V}{A} * \frac{m}{Vm} \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

f é o fluxo de cada gás;

$\frac{\Delta C}{\Delta t}$ é a variação da concentração de cada gás dentro dos microcosmos no tempo que permaneceram fechados (10 minutos);

V e A são respectivamente o volume e a área da garrafa onde foi montado o microcosmo;

m é o peso molecular de cada gás;

Vm é o volume molecular de cada gás na temperatura de amostragem.

Os fluxos foram expressos em $\mu\text{g N cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ para N₂O e $\mu\text{g C cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ para CH₄ e CO₂. Os valores de N₂O e CH₄ foram posteriormente ajustados para CO₂ equivalente, conforme seu Potencial de Aquecimento Global (GWP) em um horizonte de 100 anos, seguindo os valores sugeridos pelo IPCC (2013).

5.5. Extração de DNA da Superfície das Amostras de Material Orgânico Vegetal

A extração dos ácidos nucleicos bacterianos encontrados na superfície dos discos de folha em decomposição retirados dos microcosmos foi realizada utilizando 0,25g do material

vegetal e empregando-se o kit comercial *DNA Extraction Kit - DNA Power Soil™* (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA), seguindo o protocolo do fabricante.

5.6. Amplificação do DNA das comunidades bacterianas presentes nas amostras de material vegetal por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*)

A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi utilizada a fim de amplificar a região V6-V7 do gene bacteriano 16S rRNA das amostras (Sogin et al. 2006), visando posterior sequenciamento em larga escala. Utilizaram-se *barcodes* ligados à extremidade 5' dos iniciadores, juntamente com o *forward primer* (A-967F 5'-CAA CGC GAA GAA CCT TAC C-3';) e o primer reverso (1195R 5'-CCT CTC TAT GGG CAG TCG GTG ATC GTC RTC CCC RCC TTC C-3'; WANG, 2009). As PCRs foram conduzidas em reações de 50µL, contendo 5µL de *Buffer*, 4µL de MgCl₂, 0,4µL de dNTP, 0,5µL do primer reverso e *barcodes* (ambos a 20mM), 0,5µL de Taq polimerase e 1µL de DNA de amostra, completando-se o volume final com água ultrapura (Milli-Q).

O protocolo de amplificação utilizado foi de 94°C por 5 minutos (desnaturação), 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (anelamento), 57°C por 45 segundos (extensão) e 72°C por um minuto (extensão final), empregando-se um termociclador 96 Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems*). O tamanho esperado dos fragmentos amplificados foi confirmado em gel de agarose a 2%. O gel foi submetido a um campo elétrico de 100V por aproximadamente 45 minutos e posteriormente foto-documentado.

5.7. Purificação e Quantificação do produto da PCR

Misturas contendo aproximadamente 5µL de cada amostra (já amplificadas) foram feitas, formando *pools* que foram purificados utilizando-se o E-Gel® SizeSelect™ 2% Agarose Gel (*Life Technologies*), com um marcador referência de 50pb (pares de bases) DNA Ladder (com 12 fragmentações, de 50 a 1000pb). Os *pools* foram depositados nos poços do E-Gel em quantidades suficientes (20~25µL) para permitir a fragmentação e recuperação dos fragmentos de amostra medindo entre 200 e 300pb.

Após a purificação e recuperação dos *pools* contendo as amostras, esses foram purificados em barra magnética por meio da adição da solução Agencourt AMPure (*beads*

magnéticas), seguida da lavagem com etanol 70% e ressuspensão pela adição de LowTE (30µL), de acordo com o protocolo do fabricante (AGENCOURT®AMPure®).

Uma vez purificados, os *pools* foram quantificados no Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, *Life Technologies*), onde os resultados foram ajustados à curva padrão obtida pela adição de 190µL da solução de Qubit®dsDNA Buffer e Qubit®dsDNA Reagent às soluções Qubit®dsDNA Standard #1 e #2 (10µL de cada). A quantificação foi realizada para posterior diluição das amostras com a finalidade de deixá-las na mesma concentração (ng/mL), visando evitar a super-representação de algumas delas na etapa de sequenciamento.

5.8. Sequenciamento em Larga Escala da Comunidade Microbiana

Com o objetivo de avaliar o efeito dos tratamentos sobre a comunidade microbiana presente nos microcosmos, fez-se uso da plataforma Ion Torrent PGM™ (*Life Technologies*) para realizar o sequenciamento em larga escala do gene codificante do RNA ribossômico (16S rRNA) do domínio Bacteria. A aplicação dessa plataforma permite de modo simultâneo o sequenciamento de diversas amostras de fragmentos de 200 a 400pb.

Havendo-se construído previamente as bibliotecas (itens 4.6 e 4.7), seguiu-se o preparo do *template* no Ion OneTouch™ 2 Instrument (*Life Technologies*). Essa etapa consiste na amplificação clonal dos fragmentos dentro de micelas geradas em uma solução emulsionada, por meio de PCR em emulsão; 25µL de cada um dos *pools* foram utilizados para o processo de PCR em emulsão e enriquecimento, de acordo com o manual do Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit, da *Life Technologies*. Após elaboração do *template*, as amostras foram preparadas utilizando-se o Ion PGM Hi-Q Sequencing 400 Kit (*Life Technologies*) para serem carregadas no Ion 316™ Chip (Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit User Guide) para posterior sequenciamento no Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) (Ion Torrent, *Life Techonologies*). Ao total, foram realizadas três corridas de sequenciamento (três chips com 60 amostras), totalizando 180 amostras sequenciadas.

5.9. Análise das Sequências

O tratamento inicial das sequências adquiridas na etapa anterior (5.8) foi realizado utilizando o software *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) partindo do protocolo sugerido pelos desenvolvedores (454 *Overview Tutorial*) com adaptações. As sequências bacterianas de 16S rRNA foram convertidas em FASTQ através do comando `convert_fastaqual_fastq.py`. Em seguida, foram filtradas (remoção de *barcodes* e *forward primers*) seguindo os seguintes parâmetros: índice de qualidade > 20, comprimento das sequências >170 e <240, 6 de altura máxima do homopolímero, zero de base ambígua máxima e zero de base incompatível no primer (comando `split_libraries.py`). As sequências de *chimeras* foram identificadas utilizando a ferramenta USEARCH (Edgar, 2010, v5.2.236 e v6.1544) e excluídas por meio dos comandos `identify_chimeric_seqs.py` e `filter_fasta.py`, respectivamente. As leituras de qualidade foram então reunidas em unidades taxonômicas operacionais (OTU, em inglês, *operational taxonomic unit*) a nível de similaridade de 97% usando UCLUST (Edgar, 2010), seguida da seleção de sequências representativas pelos comandos `pick_otus.py` e `pick_rep_set.py`.

As sequências foram classificadas pela taxonomia do banco de dados *Greengenes* via “*uclust consensus taxonomy assigner*” (`assign_taxonomy.py`). As sequências representativas para cada filótipo foram alinhadas com o *Greengenes* usando PyNAST (Caporaso, 2010) através do comando `aling_seqs.py`. O alinhamento foi posteriormente filtrado (comando `filter_alignment.py`) a fim de remover *gaps* (colunas sem dados no alinhamento) e o FastTree foi utilizado para construção da árvore filogenética (Price et al. 2009), por `make_phylogeny.py`.

Para todas as análises baseadas na tabela de OTU, o tamanho das sequências foi fixado na cobertura de 14.000 sequências por amostra, com a finalidade de facilitar as análises. O QIIME também foi utilizado para calcular as métricas de α diversidade (riqueza de OTU, estimativa de riqueza de Chaol, índice de diversidade de Shannon e Diversidade Filogenética, *Faith's PD whole tree*) e a β diversidade, utilizando as distâncias de Bray-Curtis e *Weighted UniFrac*. As Análises de Coordenadas Principais (PCoA) baseadas no índice de Bray-Curtis consideram o número de espécies e sua incidência, e a distância UniFrac indica a extensão das semelhanças filogenéticas entre as comunidades bacterianas (Lozupone et al., 2005).

5.10. Quantificação do gene *mcrA* presente nas amostras por meio de PCR em tempo real

A técnica de PCR quantitativa foi utilizada com a finalidade de estimar o número de cópias do gene *mcrA* por grama de material em decomposição das amostras analisadas. Reações de 10µL foram conduzidas em triplicata utilizando 5µL de Power SYBER® Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*), 0,2µL a 20mg/mL de BSA (do inglês, *bovine serum albumin*), 1µL de cada um dos primers (*forward primer*, Mlas, 5'-GGTGGTGTMGDDTTCACMCARTA-3' e o primer reverso, *mcrAR*, 5'-CGTTCATBGCGTA GTTVGGRTAGT-3') (Steinberg et al. 2008) e 1µL de DNA amostral, completando-se o volume final com água ultrapura (Milli-Q).

O protocolo de amplificação utilizado foi de 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos, incluindo-se ao final uma curva de melting com 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, com leitura de dados a cada 0,5°C. A PCR foi conduzida em um termociclador StepOne Plus Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*).

A especificidade do produto da amplificação foi confirmado por análise da curva de Melt. Uma curva padrão foi gerada em seis ordens de magnitude, de 10⁰ a 10⁵ cópias do gene por amostra ($r^2=0,99$), partindo de um isolado contendo o gene *mcrA*, o *Methanolinea mesophila* (DSMZ 23604), procedente do depósito de culturas *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (do alemão, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, DSMZ).

5.11. Análise dos Resultados

Análises de variância (ANOVA) do tipo *three-way* para cada espécie vegetal (três níveis) com tempo (seis níveis), temperatura e pH (dois níveis cada) como fatores fixos foram utilizadas, seguidas pelo teste de Tukey HSD para verificar a incidência de diferenças significativas ao nível α 0,05 entre as médias de decomposição, constante de decomposição, emissão de gases e quantificação do gene *mcrA* obtidas durante os 45 dias de experimento. Para verificar a correlação entre a emissão de metano e o gene *mcrA*, fez-se uso do teste de Spearman ($P<0,005$), que, por meio do valor ρ (*rho*), indica o tipo de relação. Para acessar a variação temporal e efeito dos tratamentos sobre a β diversidade filogenética, foi aplicada a análise de variância permutativa multivariada (ADONIS- PERMANOVA). As análises

permutativas multivariadas foram executadas utilizando-se o tempo como fator principal.

As análises foram executadas pelos pacotes “*agricolae*”, “*phyloseq*” e “*vegan*”, e os gráficos gerados utilizando o pacote “*ggplot2*” do software estatístico R (R Development Core Team, 2009).

6. RESULTADOS

6.1. Degradação do Material Orgânico Vegetal

Através da análise do peso remanescente, foi possível calcular a porcentagem de decomposição, a qual permitiu verificar que, durante o período de estudo, a decomposição do material das três espécies diferiu estatisticamente entre si ao nível α 0,05 de significância.

As amostras de *Laguncularia racemosa* apresentaram a menor taxa de decomposição (65,9%), seguida pelas amostras de *Rhizophora mangle* (71,8%) e *Avicennia schaueriana* (74,1%).

O decaimento de peso do material vegetal apresentou o mesmo comportamento em todas as espécies, ocorrendo maior perda de peso durante os primeiros dias de experimento. Contudo, o efeito do tempo se deu de modo diferente para cada um dos tipos de matéria orgânica (**Tabela 1**). Conforme esperado, as amostras de *A. schaueriana* não apenas apresentaram as maiores taxas de decomposição, como se deram em um período menor de tempo quando comparado com as outras duas espécies.

Nas amostras de *Rhizophora mangle*, a degradação aumentou ao longo do período analisado. No intervalo entre os dias 7 a 15 de experimento, não houve diferença na taxa de decomposição, assim como no período 30 a 45 dias, apontando que, após a redução de material vegetal nos primeiros dias, o processo tornou-se mais lento. Estatisticamente, não se demonstrou a influência significativa das variáveis temperatura e pH (individualmente ou em interação) sobre os resultados encontrados, apontando o tempo como o principal agente do processo (**Figura 4a/b**).

Figura 4. Decaimento do peso seco médio do material vegetal remanescente (g) e suas respectivas médias em *R. mangle* ao longo dos 45 dias de experimento em diferentes condições de temperatura e pH (a/c), e teste de comparação de médias dos tratamentos (b.).

Letras sobre os diagramas de caixa indicam diferenças significativas a α 0.05, segundo o teste de Tukey.

Tabela 1. Comparação de médias ao nível α 0.05 de significância (Tukey HSD) da porcentagem de decomposição por espécie vegetal ao longo do tempo.

Tempo (dias)	Taxa de Decomposição por Espécie Vegetal (%)		
	<i>L. racemosa</i>	<i>R. mangle</i>	<i>A. schaueriana</i>
0	00,0 ^a	00,0 ^a	00,0 ^a
3	71,9 ^b	79,1 ^b	83,4 ^b
7	70,9 ^b	82,3 ^c	82,5 ^b
15	75,9 ^c	83,3 ^c	86,3 ^b
30	87,9 ^d	91,6 ^d	94,0 ^c
45	89,0 ^d	94,5 ^d	98,2 ^c

Nas amostras de *L. racemosa* (Figura 5a) e *A. schaueriana* (Figura 6a), o comportamento da degradação foi similar ao observado em *R. mangle*, embora a perda de material na última espécie tenha ocorrido de forma mais acentuada. Para nenhuma das espécies vegetais, os tratamentos de incubação às quais foram submetidas influenciaram significativamente no processo de decomposição em termos de peso remanescente (Figura 4b e Figura 5b).

Figura 5. Decaimento do peso seco médio do material vegetal remanescente (g) e suas respectivas médias em *L. racemosa* ao longo dos 45 dias de experimento em diferentes condições de temperatura e pH (a/c), e teste de comparação de médias dos tratamentos (b.). Letras sobre os diagramas de caixa indicam diferenças significativas a α 0.05, segundo o teste de Tukey.

Figura 6. Decaimento do peso seco médio do material vegetal remanescente (g) e suas respectivas médias em *A. schaueriana* ao longo dos 45 dias de experimento em diferentes condições de temperatura e pH (a/c), e teste de comparação de médias dos tratamentos (b.). Letras sobre os diagramas de caixa indicam diferenças significativas a α 0.05, segundo o teste de Tukey.

6.2. Degradação do Material Orgânico Vegetal em relação à Constante de Decomposição k e Tempo de Meia Vida ($t_{50\%}$)

Na fase inicial, aproximadamente cinco a sete dias após a instalação do experimento, a decomposição foi mais rápida, com todas as espécies atingindo a meia vida neste período (**Tabela 2**). Após os 15 primeiros dias de experimento, a perda de peso tornou-se mais lenta.

Tabela 2. Comparação de médias ao nível α 0.05 de significância (Tukey HSD) da constante de decomposição (k) e tempo de meia vida ($t_{50\%}$) do material foliar remanescente de *Avicennia schaueriana*, *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* sob os tratamentos aplicados ao longo dos 45 dias de experimento.

Espécie vegetal	k ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$)	$t_{50\%}$ (dias)
<i>A. schaueriana</i>	0,22 ^a	4,4 ^B
<i>R. mangle</i>	0,20 ^a	5,7 ^B
<i>L. racemosa</i>	0,16 ^b	7,4 ^A

O comportamento de k é inverso ao tempo de meia vida, ou seja, quanto menor for a constante maior será $t_{50\%}$, indicando maior recalcitrância no material orgânico. Partindo dessa consideração e observando-se que a constante k foi menor para *Laguncularia racemosa*, seguida de *Rhizophora mangle* e *Avicennia schaueriana* em todos os tempos, confirma-se que

as folhas da última espécie decompõem-se mais rapidamente quando comparada às outras duas. Esses dados se relacionam com as médias de peso remanescente encontradas para as diferentes espécies, conforme apresentado previamente.

Ao longo dos 45 dias de experimento, as médias da constante de degradação apresentaram tendência decrescente, diferindo entre si nos tempos de 3, 7 e 15 dias, e dos tempos 30 e 45 (**Figura 7a**), que por sua vez não apresentaram diferença dentro desse período. Analisando-se o comportamento do $t_{50\%}$, ocorreu o efeito oposto, ou seja, as médias do tempo de meia vida aumentaram ao transcorrer do tempo e a medida que o k diminuiu (**Figura 7b**). Assim, nos últimos estágios do experimento, o material remanescente degradou com menor velocidade, não havendo diferença significativa entre os tempos 30 e 45 dias.

Para *R. Mangle*, foram encontradas diferenças em função do tempo, onde k decresceu ao longo do período observado e do pH. As amostras incubadas a pH 7,05 apresentaram menor média ($0,168\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) do que aquelas incubadas a 6,74 ($0,178\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), ou seja, o material incubado em meio mais alcalino mostrou-se mais recalcitrante.

As amostras de *L. racemosa* seguiram o mesmo comportamento de k em função do tempo, porém quanto ao pH, apresentaram resposta oposta. Aquelas incubadas a pH 7,05 obtiveram maior média ($0,142\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) quando comparadas às de 6,74 ($0,131\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$).

Figura 7. Comportamento da constante de degradação k (a.) e tempo de meia vida ($t_{50\%}$) do material foliar das espécies estudadas (b.).

Em ambas as situações, observou-se a relação da variável do potencial Hidrogeniônico com o tempo e foi possível notar que embora tenham sido encontradas diferenças, estas ocorreram apenas em alguns pontos ao longo dos 45 dias, o que leva a crer que tenham se

dado principalmente em função do tempo e não pelo tratamento em si, não havendo sido observada sua influência na taxa de degradação, como já apresentado.

Em *A. schaueriana*, foi possível observar que a constante k se apresentou de formas diferentes ao longo do tempo, contudo, tanto a temperatura quanto o pH não influenciaram nos resultados observados, $0,181\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ a $29,5^{\circ}\text{C}$ e $0,180\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ a $27,5^{\circ}\text{C}$ e em relação ao pH, $0,184\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ a 6,74 e $0,178\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ a 7,05, não diferindo entre si.

6.3. Emissão de Gases do Efeito Estufa em Diferentes Fontes de Matéria Orgânica Vegetal

O fluxo de CO_2 com maior média de emissão ($701,82\text{ }\mu\text{g C cm}^{-2}\text{ dia}^{-1}$) foi proveniente dos microcosmos contendo *Rhizophora mangle*, seguida de *Avicennia schaueriana* ($399,73\text{ }\mu\text{g C cm}^{-2}\text{ dia}^{-1}$) e *Laguncularia racemosa* ($382,64\text{ }\mu\text{g C cm}^{-2}\text{ dia}^{-1}$) e apenas a primeira espécie diferiu significativamente no teste de Tukey ao nível $\alpha 0,05$ das demais. Os microcosmos sem adição de material vegetal (controles) e incubados nas mesmas condições daqueles contendo discos de folha das espécies estudadas apresentaram os menores fluxos de emissão de CO_2 , diferindo de todos.

A maior parte da emissão de CO_2 das amostras de *R. mangle* ocorreu durante os primeiros 20 dias de experimento e, apesar dos testes estatísticos não apontarem diferenças significativas, é possível observar que na temperatura a $27,5^{\circ}\text{C}$ e pH mais alcalino (**Figura 8a**) se deram as maiores taxas de emissão em comparação às outras condições de incubação.

Figura 8. Fluxo de emissão de carbono ($\mu\text{g C cm}^{-2}\text{ dia}^{-1}$) de *Rhizophora mangle* nas temperaturas a $27,5^{\circ}\text{C}$ (a.) e $29,5^{\circ}\text{C}$ (b.) nos diferentes níveis de pH (alto - 7,05 e baixo - 6,74).

Os microcosmos contendo material orgânico de *L. racemosa* apresentaram as menores taxas de emissão de CO₂ (**Tabela 3**). Apesar de não ter diferença estatística comprovando a ação da temperatura sobre os resultados obtidos na temperatura a 29,5°C (**Figura 9a**), se deram alguns picos de emissão maiores que a 27,5°C em ambos os pH (**Figura 9b**).

As emissões procedentes das amostras de *A. schaueriana*, assim como as de *R. Mangle*, apresentaram diferenças em função do tempo ocorrendo ao longo de todo o período analisado, mas com maior média na primeira semana de experimento. Diferente dos resultados encontrados para as espécies anteriores, a temperatura influenciou significativamente no fluxo de CO₂, havendo maior emissão nos microcosmos incubados a 29,5°C (**Figura 10a**). Realizando-se uma análise mais profunda sobre os resultados, observa-se que apesar das diferenças encontradas, elas possivelmente se devem à ocorrência de picos de emissão em alguns pontos ao longo do tempo, mas que não sucedem de forma contínua e consequentemente elevam o valor médio do fluxo.

Figura 9. Fluxo de emissão de carbono ($\mu\text{g C cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) de *Laguncularia racemosa* nas temperaturas a 27,5°C (a.) e 29,5°C (b.) nos diferentes níveis de pH (alto - 7,05 e baixo - 6,74).

Figura 10. Fluxo de emissão de carbono ($\mu\text{g C cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) de *Avicennia schaueriana* nas temperaturas a 27,5°C (a.) e 29,5°C (b.) nos diferentes níveis de pH (alto - 7,05 e baixo - 6,74).

Tabela 3. Comparação de médias para cada espécie vegetal ao nível α 0.05 de significância dos fluxos de emissão de CO_2 nas diferentes condições de incubação (temperatura e pH).

Condição de Incubação	Fluxo médio de CO_2 ($\mu\text{g C cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$)			
	<i>R. mangle</i>	<i>L. racemosa</i>	<i>A. schaueriana</i>	Controle
29,5°C	580,46 ^a	489,92 ^a	551,37 ^A	-177,10 ^{a'}
27,5°C	823,18 ^a	275,37 ^a	248,09 ^B	156,16 ^{b'}
7,05	582,29 ^a	380,75 ^A	381,16 ^A	-2,57 ^{a'}
6,74	821,35 ^a	384,53 ^A	418,3 ^A	-18,56 ^{a'}

*Letras diferentes são consideradas diferenças significativas dentro de cada condição de incubação (temperatura e pH) para cada espécie vegetal pelo teste de Tukey com α 0,05.

As emissões de metano variaram significativamente em resposta à fonte de matéria orgânica. Os microcosmos contendo discos das espécies *Avicennia schaueriana* e *Rhizophora mangle* produziram os maiores fluxos de emissão ($235,75$ e $193,87 \mu\text{g CO}_2\text{eq cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente), diferindo das médias de *Laguncularia racemosa* ($34,54 \mu\text{g CO}_2\text{eq cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) e do controle.

Para *R. Mangle*, a maior taxa de emissão de CH_4 ocorreu na primeira semana de incubação, diminuindo com o passar do tempo e mantendo-se quase constante a partir do 20º dia de experimento. Mesmo não apresentando diferença estatística, os maiores níveis médios de emissão se deram na temperatura a 27,5°C (**Figura 11a**).

Figura 11. Fluxo de emissão de metano ($\mu\text{g CO}_2\text{eq. cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) de *R. mangle* nas temperaturas a 27,5°C (a.) e 29,5°C (b.) nos diferentes níveis de pH (alto - 7,05 e baixo - 6,74).

Os microcosmos contendo amostras de *L. racemosa* apresentaram variação significativa nas taxas de emissão de metano em relação ao tempo e temperatura (**Tabela 4**). A atividade de emissão, apesar de inferior à das outras espécies estudadas, teve influência da temperatura, apresentando o maior fluxo a 29,5°C durante os primeiros 20 dias de incubação (**Figura 12b**), enquanto na faixa inferior (27,5°C), os valores foram constantemente baixos (**Figura 12a**).

Tabela 4. Comparação de médias ao nível α 0.05 de significância dos fluxos de emissão de CH₄ nas diferentes condições de incubação (temperatura e pH) dentro de cada espécie vegetal.

Condição de Incubação	Fluxo médio de CH ₄ ($\mu\text{g CO}_{2\text{eq.}}\text{cm}^{-2}\text{dia}^{-1}$)			
	<i>R. mangle</i>	<i>L. racemosa</i>	<i>A. schaueriana</i>	Controle
29,5°C	183,86 ^a	59,13 ^A	345,16 ^a	-46,75 ^{a'}
27,5°C	203,89 ^a	9,94 ^B	126,33 ^b	-13,94 ^{b'}
6,74	195,81 ^A	38,40 ^A	282,75 ^a	-26,52 ^{a'}
7,05	191,81 ^A	30,67 ^A	188,74 ^a	-34,17 ^{a'}

*Letras diferentes são consideradas diferenças significativas dentro de cada condição de incubação (temperatura e pH) para cada espécie vegetal pelo teste de Tukey com α 0,05.

O fluxo de emissão CH₄ pelas amostras de *A. schaueriana* foi bastante elevado na primeira semana de experimento, decaindo e mantendo-se constante até o final dos 45 dias de análise. Na temperatura a 29,5°C, houve um pico de emissão entre o segundo e terceiro dia para ambas as faixas de pH (**Figura 13b**). Embora com média inferior, é possível observar o mesmo comportamento nos dados obtidos a 27,5°C (**Figura 13a**). Não foi possível verificar o efeito do pH de maneira significativa na emissão de metano em nenhuma das três espécies analisadas.

Figura 12. Fluxo de emissão de metano ($\mu\text{g CO}_{2\text{eq.}}\text{cm}^{-2}\text{dia}^{-1}$) de *L. racemosa* nas temperaturas a 27,5°C (a.) e 29,5°C (b.) nos diferentes níveis de pH (alto - 7,05 e baixo - 6,74).

Em comportamento oposto ao verificado para os fluxos de CO_2 e CH_4 , a presença de material orgânico independente da fonte não implicou diferenças na produção e emissão de óxido nitroso. De modo geral, *Laguncularia racemosa* apresentou o maior fluxo de emissão deste gás ($159,18 \mu\text{g CO}_2\text{eq.cm}^{-2} \text{dia}^{-1}$), embora não tenha diferido em relação às outras duas espécies estudadas ou até mesmo do controle.

O tempo, temperatura e pH também não ocasionaram mudanças no comportamento das emissões (**Tabela 5**), independentemente de serem considerados de maneira individual ou em interação, diferentemente do ocorrido nos outros gases analisados. Apesar de haver ocorrido emissão em alguns pontos (registrada em forma de picos), ela não seguiu nenhum padrão e permaneceu constantemente baixa na maior parte do tempo.

Tabela 5. Comparação de médias ao nível α 0.05 de significância dos fluxos de emissão de N_2O nas diferentes condições de incubação (temperatura e pH) dentro de cada espécie vegetal.

Condição de Incubação	Fluxo médio de N_2O ($\mu\text{g CO}_2\text{eq.cm}^{-2} \text{dia}^{-1}$)			
	<i>R. mangle</i>	<i>L. racemosa</i>	<i>A. schaueriana</i>	Controle
29,5°C	7,08 ^a	361,99 ^A	-24,15 ^a	-42,07 ^{a'}
27,5°C	136,33 ^a	-43,63 ^A	-21,06 ^a	138,98 ^{a'}
6,74	174,20 ^A	322,26 ^A	-65,67 ^a	-5,75 ^{a'}
7,05	-30,78 ^A	-3,91 ^A	20,46 ^a	102,66 ^{a'}

*Letras diferentes são consideradas diferenças significativas dentro de cada condição de incubação (temperatura e pH) para cada espécie vegetal pelo teste de Tukey com α 0,05.

Figura 13. Fluxo de emissão de metano ($\mu\text{g CO}_2\text{eq. cm}^{-2} \text{dia}^{-1}$) de *A. schaueriana* nas temperaturas a 27,5°C (a.) e 29,5°C (b.) nos diferentes níveis de pH (alto - 7,05 e baixo - 6,74).

6.4. Quantificação do gene *mcrA* (metil coenzima M redutase)

A análise da quantificação do gene que codifica a metil coenzima M redutase (*mcrA*) apontou uma diferença significativa entre as amostras de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa*, indicando maior número de cópias do gene presentes no material oriundo da primeira espécie. Ainda para *R. Mangle*, a abundância do gene não apresentou discrepância nos primeiros 15 dias de experimento, mas observou-se diferença em relação ao período de 30 a 45 dias, no qual houve um aumento de cópias (**Figura 14a**).

As amostras provenientes dos microcosmos contendo *L. racemosa* demonstraram diferença para os 30 primeiros dias com o último ponto de coleta de dados, uma vez que houve aumento da abundância do gene (**Figura 14b**).

Para aquelas procedentes de *A. schaueriana*, observou-se que o número de cópias do gene e seu comportamento no tempo sofreram influência da temperatura elevada. Nas amostras incubadas a 27,5°C, os resultados não apresentaram diferenças mesmo com o decorrer do tempo, oposto ao observado nas incubadas a 29,5°C, em que se verificou um aumento gradual da abundância do gene *mcrA*, mesmo que havendo apenas significância na diferença entre os primeiros tempos com o último (**Figura 14c**). Apesar de o pH não ter influenciado significativamente nos resultados, as maiores médias ocorreram com a variável a 7,05 para todas as espécies.

Figura 14. Cópias do gene *mcrA* (log. ngDNA) ao longo do período observado para as amostras de *R. mangle* (a.), *L. racemosa* (b.) e *A. schaueriana* (c.).

6.4.1. Correlação entre o gene *mcrA* e a Emissão de Metano

O método de correlação de Spearman ($P < 0,005$) foi utilizado para verificar a relação entre a abundância do gene funcional *mcrA* e a taxa de metano acumulada. Nas amostras de *R. mangle* ($P = 0,0003$; $\rho = 0,44$) e *L. racemosa* ($P = 0,0013$; $\rho = 0,41$), foi observada uma relação moderada entre a modulação do gene *mcrA* e o CH_4 durante o período analisado (**Figura 15a/b**). Já para o material proveniente de *A. schaueriana*, o teste não indicou significância ($P = 0,230$), impossibilitando o estabelecimento de uma relação.

Figura 15. Correlação entre o gene *mcrA* e emissão de metano em *Rhizophora mangle* (a.) e *Laguncularia racemosa* (b.) sob disposição das variáveis temperatura e pH.

6.5. Medidas de Alpha (α) Diversidade

Determinamos a α diversidade da comunidade das espécies vegetais ao longo do período de decomposição utilizando os dados do sequenciamento da região V6-V7 do gene bacteriano 16S rRNA. Quando comparados entre as espécies vegetais, os índices de α diversidade não indicaram diferenças em função da origem do material (**Anexo 3**). Assim, do mesmo modo que para as análises anteriores e visando diminuir a incidência de fatores mascarando os resultados, a α diversidade foi analisada individualmente dentro de cada espécie para poder inferir a ação dos tratamentos e do tempo.

Para *Rhizophora mangle* e *Avicennia schaueriana*, foram encontradas diferenças para o tempo ao nível α 0,05 quanto às OTUs observadas (**Figuras 16a e 18a**), mas não para as outras métricas (**Anexo 3; Figuras 16b/d e 18b/d**). Por outro lado, para as amostras de *Laguncularia racemosa*, diferenças significativas no tempo foram observadas no índice de Shannon, e para o tempo e temperatura, em relação ao número de OTUs observadas, Chao1 e Diversidade Filogenética (*Faith's PD whole tree*; **Figura 17**).

Figura 16. Comparação dos resultados obtidos entre os diferentes índices de α diversidade em *R. mangle*. A cor interna dos diagramas aponta a temperatura e o contorno pH. (a.) OTUs observadas (letras sobre os diagramas indicando diferença ao nível α 0,05 pelo teste de Tukey); (b.) Estimativa de Riqueza de Chao1; (c.) Índice de Diversidade de Shannon e (d.) Diversidade Filogenética.

Figura 17. Comparação dos resultados obtidos entre os diferentes índices de α diversidade em *L. racemosa*. A cor interna dos diagramas aponta a temperatura e o contorno pH. (a.) OTUs observadas (letras sobre os diagramas indicando diferença ao nível α 0,05 pelo teste de Tukey); (b.) Estimativa de Riqueza de Chao1; (c.) Índice de Diversidade de Shannon e (d.) Diversidade Filogenética.

Figura 18. Comparação dos resultados obtidos entre os diferentes índices de α diversidade em *A. schaueriana*. A cor interna dos diagramas aponta a temperatura e o contorno pH. (a.) OTUs observadas (letras sobre os diagramas indicando diferença ao nível α 0,05 pelo teste de Tukey); (b.) Estimativa de Riqueza de Chao1; (c.) Índice de Diversidade de Shannon e (d.) Diversidade Filogenética.

6.6. Composição da Comunidade Bacteriana

A comunidade encontrada nas amostras de *Rhizophora* sp. foi composta predominantemente por membros dos filos Proteobacteria (68,02%), Firmicutes (10,58%), Actinobacteria (4,15%), Chloroflexi (2,88%) e Bacteroidetes (2,65%). A nível de classe, os grupos mais abundantes foram Gammaproteobacteria (42,12%), Deltaproteobacteria (12,27%), Alphaproteobacteria (9,40%), Clostridia (9,25%), Epsilonproteobacteria (3,65%) e Actinobacteria (2,85%; **Figura 19**). Ao longo do período observado, foi possível observar um decréscimo na população de Gamaproteobacteria (66,86% para 38,95%) e aumento na de Deltaproteobacteria (5,71% para 24,89%) e Anaerolineae (0,2% para 3,60%).

Quanto à temperatura, foi possível observar maior abundância de Bacteroidetes a 27,5°C (3,0%) do que a 29,5°C (2,0%). A nível de classe, a incidência de Clostridia na temperatura elevada foi superior aos valores encontrados a 27,5°C, sendo 10,30% e 8,40%,

respectivamente. Foi constatada também maior abundância de Alpha e Betaproteobacteria nas condições mais ácidas (10,39% e 1,71% na devida ordem) do que no pH a 7,05 (8,44% e 1,31%). O contrário foi observado para Clostridia, em que a abundância relativa foi 10,51% no meio mais alcalino e 8,18% no mais ácido.

Figura 19. Composição da comunidade bacteriana em *R. mangle* a nível de classe (linhas e colunas representam o pH e a temperatura de incubação, respectivamente).

Interessados em complementar os resultados de decomposição da matéria orgânica e emissão de gases, ordens associadas às BRS foram analisadas e foi possível notar que a abundância de *Desulfobacterales* (8,50%), *Desulfovibrionales* (0,70%) e *Desulfomonadales* (1,30%) foi maior na temperatura a 29,5°C do que na inferior (6,60%, 0,50% e 1,20% respectivamente). Para o pH, ocorreu maior incidência de *Desulfobacterales* (8,0%) nas amostras incubadas a 6,74 do que no meio mais alcalino (7,1%). Para os outros grupos, não houve alterações independente do valor de incubação.

Para as amostras contendo material procedente de *Laguncularia* sp., os filos predominantes foram os mesmos que para *R. mangle*, havendo, no entanto, diferente distribuição, sendo Proteobacteria (68,37%), Firmicutes (8,27%), Actinobacteria (5,70%), Chloroflexi (3,88%) e Bacteroidetes (2,06%). A nível de classe (**Figura 20**), os grupos mais

abundantes foram Gammaproteobacteria (43,61%), Deltaproteobacteria (15,40%), Clostridia (7,21%), Alphaproteobacteria (4,70%) e Actinobacteria (3,86%). Durante os 45 dias de experimento, foi observada a diminuição de Gammaproteobacteria (50,64% para 25,49%) e Epsilonproteobacteria (5,86% para 1,28%) e aumento nas populações de Deltaproteobacteria (14,81% para 33,96%) e Acidimicrobiia (0,58% para 1,50%).

Figura 20. Composição da comunidade bacteriana em *L. racemosa* a nível de classe (linhas e colunas representam o pH e temperatura de incubação, respectivamente).

Do mesmo modo que nas amostras de *Rhizophora* sp., a abundância de Bacteroidetes também foi superior na temperatura a 27,5°C (2,50%) do que na condição elevada (1,70%). A nível de classe, Alphaproteobacteria teve maior ocorrência a 27,5°C (6,40%) do que a 29,5°C (3,86%). Por outro lado, na temperatura a 29,5°C e pH mais alcalino, houve maior incidência de Clostridia (8,11% e 8,07%) do que a 27,5°C e pH a 6,74 (5,80% e 5,76%, respectivamente). A abundância relativa de Alpha e Betaproteobacteria foi respectivamente de 5,55% e 1,72% nos tratamentos mais ácidos, superior aos valores encontrados para as amostras incubadas em pH a 7,05. Verificou-se, também, maior abundância de Gammaproteobacteria nos estágios iniciais na temperatura a 29,5°C (46,48%) do que a 27,5°C (34,17%) e maior incidência de Actinobacteria a 27,5°C (5,48% e 2,48% a 29,5°C).

Quanto aos grupos associados às redutoras de sulfato, verificou-se maior abundância nas amostras procedentes do material incubado a 29,5°C, dos quais 11,90% são

Desulfobacterales, 0,50% são *Desulfovibrionales* e 2,80% são *Desulfomonadales* (correspondendo a 9,10%, 0,40% e 1,90% das amostras a 27,5°C). Para o pH, não foram registradas alterações.

Nos microcosmos contendo *Avicennia* sp., a comunidade foi composta majoritariamente por Proteobacteria (62,29%), Firmicutes (17,37%), Bacteroidetes (2,88%), Chloroflexi (2,75%) e Actinobacteria (1,94%). As classes mais dominantes foram Gammaproteobacteria (31,53%), Clostridia (15,31%), Deltaproteobacteria (11,62%), Alphaproteobacteria (9,33%) e Epsilonproteobacteria (9%; **Figura 21**). No decorrer do experimento, ocorreu um aumento na população de Deltaproteobacteria (4,89% para 25,91%), Alphaproteobacteria (2,47% para 8,84%) e Anaerolineae (0,20% para 6,74%), enquanto houve diminuição nas classes de Gammaproteobacteria (51,63% para 29,46%) e Clostridia (21,64% para 2,42%).

Figura 21. Composição da comunidade bacteriana em *A. schaueriana* em nível de classe (linhas e colunas representam o pH e temperatura de incubação, respectivamente).

Repetindo o comportamento observado nas espécies vegetais anteriores, houve maior abundância de Bacteroidetes a 27,5°C (3,0%) do que na temperatura elevada (2,5%). Contudo, a incidência de Firmicutes foi superior a 29,5°C, correspondendo a 20,50% da abundância relativa, contra 12,50% na temperatura a 27,5°C. Ainda, do mesmo modo que em

Laguncularia sp., a abundância de Clostridia foi superior a 29,5°C e pH alcalino (17,89% e 15,04%) do que a 27,5°C e meio mais ácido (10,76% e 13,62% na devida ordem).

Conforme anteriormente observado nas amostras de *R. mangle*, constatou-se maior abundância de *Desulfobacterales* do material proveniente da incubação a 29,5°C (6,80% contra 5,40% a 27,5°C) e pH a 6,74 (6,90%) em comparação com o pH alcalino (5,30%). Para *Desulfovibrionales*, observou-se o comportamento oposto em relação à temperatura (4,50% a 27,5°C e 1,5% a 29,5°C) e não houve alterações em função dos tratamentos para *Desulfomonadales*.

Com a finalidade de compreender melhor os resultados obtidos para a emissão de metano, a abundância de *Methylococcales*, ordem da classe Gammaproteobacteria associada à maioria dos grupos metanotróficos, foi analisada e encontrou-se baixa incidência nas amostras de *Rhizophora* sp., *Laguncularia* sp. e *Avicennia* sp. (0,5%, 0,1% e 0,1%, respectivamente).

6.7. Beta (β) Diversidade Filogenética

Para acessar a β diversidade filogenética bacteriana entre as diferentes espécies vegetais, utilizamos a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada no índice de Bray-Curtis (**Figura 22a**) e na distância UniFrac (**Figura 22b**). A PCoA utilizando Bray-Curtis (explicação de 26,1% da variação total) mostrou um agrupamento da comunidade bacteriana variando de acordo com o tipo de espécie vegetal. Embora a dissimilaridade tenha sido notória quanto à origem do material, ela não pode ser vista para o tempo, ocorrendo formação de pequenos *clusters* para cada período de análise apenas para as amostras de *Avicennia* sp. No entanto, entre os 30 e 45 dias, há maior similaridade entre as comunidades das três espécies vegetais, formando um novo agrupamento em função do tempo.

Figura 22. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das diferentes espécies vegetais. (a.) Baseado no índice de Bray-Curtis; (b.) Utilizando a distância *weighted* UniFrac.

Por outro lado, na análise das coordenadas principais baseada na distância *weighted* UniFrac (explicação de 31,7% da variação total), não foi possível distinguir agrupamentos para as comunidades de cada uma das espécies vegetais nos diferentes tempos de análise, com exceção de algumas amostras de *Rhizophora* sp. e *Laguncularia* sp. no tempo sete, que apresentaram maior similaridade entre si, formando um *cluster* distante do resto das amostras.

Com a finalidade de compreender melhor o efeito dos tratamentos aplicados, novas análises de Coordenadas Principais (PCoA, baseadas em Bray-Curtis e *weighted* UniFrac) foram geradas para cada uma das espécies vegetais estudadas.

Para as amostras de *R. Mangle*, as PCoA baseadas no índice de Bray-Curtis (explicação de 46,4% da variação total) mostraram-se mais dissimilares entre os estágios de sucessão de tempo (**Figura 23a**) do que entre as temperaturas e pH utilizados na incubação (**Figura 23 b e c**), sendo possível reconhecer a formação de agrupamentos para o primeiro e último tempo de análise. A análise permitiu também observar a alteração das principais ordens que compunham a comunidade bacteriana, predominantemente estruturada por Vibrionales no início e por Desulfobacterales e Chromatiales ao final do experimento.

Figura 23. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada no índice de Bray-Curtis em *Rhizophora mangle*. Ordenação em função de (a.) tempo e ordem; (b.) temperatura e (c.) pH.

Em contrapartida, a PCoA utilizando UniFrac (explicação de 56,4%) não permitiu diferenciar dissimilaridade entre os diferentes tempos de análise (embora as amostras do terceiro e sétimo dia tenham ficado mais distantes do agrupamento principal), temperatura e pH (**Figura 24a/c**). No entanto, assim como na análise anterior, foi possível observar diferenciação na composição a nível de ordem na estrutura da comunidade, em que Desulfobacterales e Chromatiales estão mais agrupados nos estágios finais.

Figura 24. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada na distância weighted UniFrac em *Rhizophora mangle*. Ordenação em função de (a.) tempo e ordem; (b.) temperatura e (c.) pH.

As PCoA baseadas no índice de Bray-Curtis geradas a partir das amostras obtidas dos microcosmos contendo *L. racemosa* (explicação de 42,2% da variação total) revelaram maior similaridade entre os períodos finais de análise do que os primeiros, organizados de forma mais dispersa, não havendo formação de *clusters*. Foi possível observar também maior dissimilaridade das comunidades no sétimo dia, correspondendo a organismos da ordem Enterobacterales (**Figura 25a**). Na análise utilizando UniFrac, cuja soma dos eixos explicou 53,8% da variação total, não foi possível distinguir o agrupamento das comunidades em nenhum dos períodos (**Figura 26a**). No entanto, em ambas as análises, observou-se a incidência e agrupamento a nível de ordem de Desulfobacterales e Clostridiales ao final do experimento.

Figura 25. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada no índice de Bray-Curtis em *Laguncularia racemosa*. Ordenação em função de (a.) tempo e ordem; (b.) temperatura e (c.) pH.

Ainda, em ambas as análises não foi possível diferenciar agrupamentos pelo pH (**Figura 25c** e **Figura 26c**). Já para a temperatura, a PCoA por UniFrac mostrou dissimilaridade para as comunidades a 27,5°C e 29,5°C em determinado ponto da amostragem (**Figura 26b**).

Para as amostras provenientes de *A. schaueriana*, a PCoA obtida por Bray-Curtis (explicação de 49,6% da variação total) mostrou um claro agrupamento das comunidades bacterianas nos diferentes estágios de tempo, havendo maior dissimilaridade entre os *clusters* dos períodos iniciais (três e sete dias) com os finais (trinta e quarenta e cinco dias), que são mais similares entre si (**Figura 27a**). O mesmo comportamento de ordenação foi observado em relação à taxonomia, em que foi possível visualizar um agrupamento com alta similaridade da ordem Clostridiales e Oceanospirillales, mais distantes de um grupo de Campylobacterales e do *cluster* de Chromatiales e Desulfobacterales. Para a temperatura e pH, não foi possível distinguir a formação de *clusters* devido à alta similaridade. (**Figura 27b/c**)

Figura 26. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada na distância weighted UniFrac em *Laguncularia racemosa*. Ordenação em função de (a.) tempo e ordem; (b.) temperatura e (c.) pH.

Por outro lado, na PCoA utilizando UniFrac (explicação de 62,9% da variação total), o agrupamento que era evidente na análise anterior não foi mostrado. Foi possível notar que houve agrupamentos pelos diferentes períodos de tempo, contudo, eles apresentaram baixa dissimilaridade entre si, o que é possível notar dada a alta proximidade entre as amostras. Da mesma forma que na análise baseada no índice de Bray-Curtis, observou-se a nível de ordem taxonômica o agrupamento de Clostridiales dissimilar ao de Campylobacterales e de Chromatiales e Desulfobacterales, com maior similaridade entre si (**Figura 28a**). Quanto à temperatura e ao pH, não houve identificação da formação de *clusters* dada a baixa dissimilaridade das amostras em relação ao tratamentos (**Figura 28b/c**).

Figura 27. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada no índice de Bray-Curtis em *Avicennia schaueriana*. Ordenação em função de (a.) tempo e ordem; (b.) temperatura e (c.) pH.

6.8. Variações na β diversidade Filogenética

Análises do tipo PERMANOVA (baseadas na distância Bray-Curtis) revelaram diferenças significativas ($P < 0,001$) para as amostras de *Rhizophora* sp. no tempo, responsável por 20,3% da variância encontrada. Em contrapartida, a temperatura e o pH não tiveram significância na variação da estruturação das comunidades bacterianas. A interação entre as condições de incubação também não influenciou de modo significativo, tendo baixa influência sobre as variações encontradas e explicando a baixa incidência de *clusters* (Tabela 6).

Nas amostras obtidas a partir de *Laguncularia* sp., também foram encontradas variações significativas para o tempo, apesar de explicar apenas 13,6% das variações. A temperatura também representou diferenças significativas ($P < 0,05$) sobre a variação na β diversidade, contudo, a contribuição foi baixa (3,17%). A interação do tempo e da

temperatura, ainda que fraca, também explica parte das variações encontradas e a forma de agrupamento. Não foram encontradas significâncias para o pH.

Figura 28. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada na distância weighted UniFrac em *Avicennia schaueriana*. Ordenação em função de (a.) tempo e ordem; (b.) temperatura e (c.) pH.

Da mesma forma que para *R. mangle*, nas amostras de *Avicennia* sp. apenas o tempo revelou diferença significativa, sendo responsável por 23,9% das variações, e a interação entre os tratamentos teve baixo efeito sobre elas.

Tabela 6. Resultados da PERMANOVA testando o efeito do tempo, temperatura e pH na composição da comunidade bacteriana.

	Pseudo-F	R²	P
<i>Rhizophora mangle</i>			
Tempo	14,559	0,20345	0,001
Temperatura	0,674	0,01169	0,855
pH	0,68277	0,01184	0,851
Tempo: Temperatura	0,7969	0,01121	0,647
Tempo: pH	0,5744	0,00811	0,951
Temperatura: pH	0,67255	0,0118	0,828
<i>Laguncularia racemosa</i>			
Tempo	8,6506	0,13591	0,001
Temperatura	1,8016	0,03172	0,042
pH	0,51982	0,00936	0,976
Tempo: Temperatura	2,7612	0,03991	0,006
Tempo: pH	0,5443	0,00869	0,959
Temperatura: pH	0,92389	0,01643	0,491
<i>Avicennia schaueriana</i>			
Tempo	18,2720	0,23956	0,001
Temperatura	1,0450	0,0177	0,372
pH	0,60384	0,0103	0,871
Tempo: Temperatura	1,2835	0,01664	0,183
Tempo: pH	0,8063	0,01065	0,614
Temperatura: pH	0,47727	0,00821	0,986

7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

7.1. Degradação do Material Orgânico Vegetal

No ecossistema manguezal, toda a matéria orgânica que não é exportada pela ação das marés entra nos sedimentos e é degradada ou modificada quimicamente pela ação microbiana. Cerca de 30% a 50% da matéria orgânica contida nas folhas de mangue, constituída por componentes solúveis em água como taninos e açúcares, é lixiviável. A parcela remanescente consiste basicamente em polímeros estruturais das plantas e lignocelulose (Kristensen et al. 2008; Benner et al. 1985a).

O processo de decomposição se inicia com a lixiviação da fração solúvel (na maior parte componentes não lignocelulósicos) e estima-se que as folhas recém caídas que submergem na água perdem entre 20% a 40% do carbono orgânico em decorrência do fenômeno em um período de 10 a 14 dias (Kristensen et al. 2008), como observado para todos os materiais neste estudo.

A degradação da matéria orgânica varia em função de diversos fatores, entre eles a caracterização da serapilheira (diferenças nas concentrações de polissacarídeos, lignina, celulose e hemicelulose) e as condições ambientais em que o material se encontra (Gessner et al. 1999; Benner et al. 1985a). A relação carbono-nitrogênio (C:N) do material estudado é outro fator importante relacionado à biodegradação da lignocelulose e tipicamente apresenta um padrão exponencial de decaimento (Kristensen et al. 2008; Benner et al. 1985b).

Estudos prévios realizados para avaliar a taxa de decomposição em folhas de mangue apontam que a procedência do material vegetal influencia a taxa e o tempo de meia vida de decomposição. Mendonça (2006) estudou a taxa de decomposição de três espécies vegetais dispostas em diferentes locais em um manguezal no Pará e observou que o tipo de planta apresenta diferenças significativas no processo, relatando perdas rápidas de massa foliar no início do experimento e perdas mais lentas nos intervalos intermediários e finais, como encontrado no presente estudo, em que a taxa de degradação foi diferente para cada uma das espécies, ocorrendo perdas rápidas de peso nos primeiros dias do período observado.

Em experimento similar, comparando a decomposição de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* em um manguezal na Bahia, Oliveira (2010) relata a diferença entre as espécies, as quais atingiram o $t_{50\%}$ no período de 30 a 45 dias seguido de uma redução da velocidade no processo. No presente estudo, a meia vida variou entre 4 a 7 dias, resultado que

atribuímos ao aumento da superfície de contato, uma vez que trabalhamos com pequenos discos foliares e não com folhas inteiras.

Mendonça (2006), ao verificar que em *R. mangle* o processo ocorre de modo mais lento que em *L. racemosa* e *Avicennia germinans*, sugere que tal comportamento tenha se dado em decorrência da relação C:N e teores de lignina, menores nas folhas de *Avicennia* sp. do que nas outras espécies, sugerindo que os microrganismos decompositores têm preferência pela disponibilidade de nutrientes, o que acelera o processo.

Resultados semelhantes já haviam sido relatados por Robertson (1988), que em teste com três espécies vegetais de mangue na Austrália, uma sendo *Avicennia* sp. e as outras *Rhizophora* sp., observou as taxas mais rápidas de decomposição para a primeira espécie, que continha maior concentração inicial de nitrogênio (baixa relação C:N) e baixa concentração de taninos, contrário às espécies de *Rhizophora* com características opostas. Além de evidenciar que, à medida que havia perda de taninos por lixiviação, aumentava a densidade microbiana. Essa informação condiz com estudos já apontados na literatura quanto aos taninos serem uma classe de substâncias fenólicas com a propriedade de se combinarem com proteínas e outros bipolímeros, o que lhes atribui propriedades adstringentes e potencial inibitório de microrganismos, uma vez que retardam o estabelecimento de populações microbianas (Godoy et al. 1997; Kathiresan & Bingham, 2001; Benner et al. 1986).

No presente estudo, não foram realizadas análises da composição foliar, logo não é possível evidenciar porque as folhas de *L. racemosa* apresentaram menor taxa de decomposição que as de *R. mangle*, contrário à maioria dos estudos descritos. Contudo, os resultados encontrados por Moitinho (2016) com as mesmas espécies vegetais e procedentes do mesmo manguezal (Cananéia) corroboram nossos resultados.

Além disso, em estudo de composição foliar realizado na mesma área de coleta e com as mesmas espécies, as folhas de *Avicennia schaueriana* apresentaram as maiores concentrações de nitrogênio, enquanto na mesma espécie os teores de taninos não foram detectados. Por outro lado, o teor de taninos apresentou maior incidência em *L. racemosa* do que para *R. mangle* e as concentrações de nitrogênio foram muito semelhantes em ambas as espécies (Godoy et al. 1997), resultados que suportam os resultados aqui obtidos e levam a crer que essas características moldam o comportamento de degradação observado, característico para as espécies nessa região.

Diversos autores relatam a influência de fatores abióticos ambientais no processo de decomposição, tais como a altura e incidência das marés, regime pluviométrico e temperatura, sendo este último um dos parâmetros de maior importância (Robertson, 1988; Gessner et al.

1999; Kathiresan & Bingham, 2001; Mendonça, 2006; Oliveira, 2010; Aké-Castillo et al. 2006).

A relação C:N das folhas varia de acordo com a temperatura. A elevação da temperatura leva à maior concentração de nitrogênio e modifica a qualidade nutricional vegetal, alterando consequentemente a sua palatabilidade e dos detritos, que se tornam mais atrativos para consumo, tanto por parte dos invertebrados como microbiano (Kristensen et al. 2008; Rezende et al. 2013). Em experimento de decomposição *in situ*, Mfilinge (2008) observou que além de mudar a relação C:N, o aumento da temperatura acelerou a função metabólica dos invertebrados, que passaram a consumir maiores quantidades de folhas, aumentando a superfície de contato e o *input* de detritos orgânicos nos sedimentos, estimulando os microrganismos decompositores.

Em estudo comparando as taxas de degradação de *Rhizophora mangle* e *Avicennia schaueriana* em duas épocas do ano (inverno e verão), em florestas de mangue em Santa Catarina, Rezende (2013), ao observar um aumento na constante k para ambas as espécies durante o verão em decorrência da elevação da temperatura, concluiu que este fator é importante para a decomposição em manguezais, onde apenas alguns graus podem ser suficientes para aumentar a atividade metabólica das comunidades de decompositores ou até mesmo acelerar a degradação das folhas, influenciando no processo como um todo.

Para a decomposição de *Avicennia marina* em duas estações do ano, Mackey&Smail (1996), já haviam notado que as maiores taxas de degradação ocorriam no verão e atribuíram à umidade e temperatura mais elevadas os resultados encontrados.

Nossos resultados não apontaram a temperatura como um fator de influência significativo, o que pode ter ocorrido em função da variação térmica utilizada. Isto é, o acréscimo de 2°C pode não ter sido suficiente para interferir no processo de decomposição de matéria orgânica. Acredita-se que isto possa ter acontecido uma vez que a variação média de temperatura do período mais frio para o mais quente é de 5,13°C, e durante a própria estação mais quente (dezembro a março) há uma diferença de 2,85°C (**Anexo 2**; Banco de Dados do Levitus), valores superiores ao empregado para as incubações.

É possível que os processos envolvidos na degradação de matéria orgânica na área de estudo, tal como a microbiota associada, estejam adaptados a alterações nessa faixa de temperatura (+2°C). Nos estudos com diferenças de temperatura em que foram relatadas alterações na taxa de decomposição e relação C:N, as variações foram de 3°C e 5,3°C para estudos *in situ* (Rezende et al. 2013; Mackey&Smail, 1996) e de 8°C para testes *in vitro* (Steinke&Charles, 1986).

O pH é uma variável que depende de distintos fatores, como gradiente e frequência de marés, qualidade nutricional da serapilheira, condutividade elétrica da água e de diversas reações bioquímicas que sucedem na interface solo-solução dos sedimentos (Tam et al. 1995; Mackenzie et al. 1995). Os diversos processos metabólicos que ocorrem nos sedimentos, como a oxidação de FeS_2 e FeS para H_2SO_4 , hidrólise de taninos, formação de amônio e hidroxilas provocam mudanças constantes nos valores de pH, concedendo estabilidade ao sistema (Tam et al. 1995).

No presente estudo, a água do mar foi acidificada através da diminuição do potencial Hidrogeniônico em 0,31 unidades (como descrito no **Material e Métodos**), contudo, o pH dos sedimentos já era inferior ao modificado (em 0,8 unidades; **Anexo 1**). Possivelmente, a baixa influência do pH nos resultados obtidos se deva ao baixo impacto provocado pela diminuição do pH da lâmina de água adicionada, uma vez que a solução do solo apresentava valores inferiores.

Para os resultados encontrados em que sucedeu a degradação mais rápida de *R. mangle* em meio mais ácido, presume-se que possam ter ocorrido por se tratar de uma espécie mais suscetível a mudanças abióticas, e que ao passar por certas alterações, torna-se mais atraente para o consumo microbiano (Rezende et al. 2013).

Por outro lado, os resultados obtidos para as amostras de *Laguncularia* sp., em que maior taxa de degradação ocorreu em meio mais alcalino, condizem com os encontrados por Benner (1985b) em estudo conduzido para avaliar os efeitos do pH na biodegradação de diferentes fontes de lignocelulose. O autor aponta a dificuldade em diferenciar os efeitos do pH de maneira isolada da ação dos ácidos orgânicos, que inativam a ligação de enzimas e inibem a atividade microbiana, retardando o processo de decomposição. Em suas análises, a taxa de mineralização de lignocelulose foi fortemente afetada pelo pH, onde os maiores níveis ocorreram em meio alcalino. A degradação microbiana realizada por enzimas extracelulares, como degradadoras de lignina e celulose, foi inibida pelas condições ácidas no local de estudo, sendo a acidez decorrente da presença de ácidos orgânicos. Assim, conclui-se que baixos valores de pH contribuem para as baixas taxas de degradação de lignocelulose.

Além disso, os níveis de acidez podem afetar a colonização superficial do material vegetal pelas comunidades fúngicas, processo que ocorre nos estágios iniciais da decomposição, apesar das bactérias serem as degradadoras predominantes de lignina e componentes polissacarídicos de lignocelulose (Kathiresan & Bingham, 2001; Benner et al. 1985a).

Cabe ressaltar que este trabalho foi conduzido em microcosmos sobre condições controladas em laboratório. Sendo assim, os resultados gerados, apesar de serem válidos e proporcionarem noções de comportamento, não necessariamente representam os processos que ocorrem *in situ* em um ambiente natural.

7.2. Emissão de Gases do Efeito Estufa e Abundância do gene *mcrA*

Devido ao grande aporte constante de matéria orgânica e taxa lenta de degradação, os manguezais constituem um ecossistema com características favoráveis à proliferação de microrganismos associados à emissão de gases do efeito estufa (Holguin et al. 2001). Os processos microbianos relacionados à emissão de GEE são regulados por diversos parâmetros, incluindo, disponibilidade de oxigênio, temperatura e conteúdo de água dos sedimentos, potencial de oxirredução (E_h), salinidade e pH, além de biodisponibilidade de fontes de carbono e nitrogênio (Bauza et al. 2002).

Para os resultados obtidos, foram encontradas diferenças de comportamento na emissão de CO_2 e CH_4 entre as três espécies. Isto indica que apesar do sedimento utilizado nos microcosmos ter sido o mesmo para todos os tratamentos, a fonte de matéria orgânica provocou alterações na estruturação da comunidade microbiana já presente, e, consequentemente, no processo de emissão de gases. Tais diferenças convergem com os resultados encontrados para a degradação de material orgânico, que variou conforme a espécie vegetal, ou seja, a composição química das folhas, a disponibilidade e qualidade dos nutrientes e as condições edáficas afetam a emissão de CO_2 e CH_4 (Oertel et al. 2016; Nóbrega et al. 2016).

Oertel (2016) aponta que o aumento da temperatura resulta em maiores emissões e maior taxa de respiração, podendo ser considerado como *feedback* positivo do aumento do metabolismo microbiano. Dessa forma, apesar de o fluxo de CO_2 ter diminuído ao longo do período observado e de não seguir um padrão de emissão, ele pode ser considerado como um indicador de atividade microbiana.

Os resultados provenientes das amostras de *Laguncularia racemosa* e *Avicennia schaueriana* que tiveram as maiores emissões de CO_2 registradas na maior temperatura condizem com diversos estudos descritos na literatura, em que temperaturas elevadas estimulam o metabolismo dos microrganismos decompositores.

O aumento da temperatura está correlacionado com a emissão de dióxido de carbono devido ao estímulo de genes associados à decomposição, principalmente dos filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinomycetes*, *Cyanobacteria* e *Fungi* (Wang et al. 2012). Em experimento conduzido em microcosmos com sedimentos provenientes de uma área inundada em Ohio (Estado Unidos) para verificar variações no fluxo de CO₂ e CH₄, observou-se maior emissão de ambos os gases com a elevação de 10°C (Brooker et al. 2014).

Maiores fluxos de emissão destes dois gases também foram registrados em decorrência do aumento da temperatura entre as estações do ano (27,45°C no verão e 11,01°C no inverno) em um estudo no estuário do Rio Min na China. O autor atribui ao aumento da temperatura o estímulo da degradação da matéria orgânica e, consequentemente, a alteração na emissão (Hu et al. 2016). Ao verificar a variação sazonal da emissão de CO₂ em um mangue subtropical, Chen (2012) também observou os maiores fluxos durante a estação mais quente (32,8°C).

Para as amostras de *Rhizophora mangle* em que as maiores taxas de emissão de CO₂ se deram na faixa inferior de temperatura, acredita-se que a composição química do material tenha resultado na seleção de comunidades microbianas com melhor rendimento metabólico na faixa dos 27°C. Em estudo sobre a emissão de GEE em sedimentos de mangue na Austrália, Allen (2011) aponta que, embora tenha encontrado os maiores fluxos de emissão durante o verão, as diferenças de emissão estão altamente relacionadas às concentrações de C e N encontradas nos sedimentos entre os lugares de amostragem.

Leopold (2015) atribui as variações sazonais nos fluxos de dióxido de carbono a diversos fatores e aponta a umidade e a temperatura como os parâmetros mais importantes. De acordo com a autora, em experimento *in situ*, temperaturas muito elevadas e a alta incidência de luz sobre os sedimentos foram responsáveis pela diminuição da respiração do solo e estímulo dos microrganismos fotoautotróficos na superfície do sedimento, levando a formação de biofilme, com consequente diminuição na emissão de CO₂ em períodos com temperaturas superiores a 26°C. Uma vez que foi realizado em laboratório, este tipo de comportamento não foi observado no presente estudo, mas expressa a complexidade das relações entre os diversos fatores bióticos e abióticos envolvidos no processo.

Os fluxos de emissão de metano também foram alterados conforme a fonte da matéria orgânica. Nos microcosmos contendo *Rhizophora* sp., seguindo o comportamento encontrado para CO₂, as maiores taxas de emissão de CH₄ se deram em menor temperatura, confirmando que a composição do material em um primeiro momento foi o fator de maior influência em

selecionar as comunidades microbianas, as quais respondem de modo diferente às diversas condições a que são expostas.

Nas amostras de *Laguncularia* sp. e *Avicennia* sp., as maiores emissões de CH₄ foram registradas em temperatura elevada, contudo, para a última espécie, foi observada alta taxa de emissão apenas nos primeiros dias.

Para a produção de metano, é relatado que alterações relativamente pequenas na temperatura são suficientes para aumentar sua emissão. O estímulo da degradação da matéria orgânica decorrente do aumento da temperatura altera o fluxo de carbono e de elétrons, o que favorece a metanogênese, dado que o processo é impulsionado por valores negativos de E_h (Oertel et al. 2016; Hu et al. 2016; Nóbrega et al. 2016; Konnerup et al. 2014), coincidindo com os resultados por nós obtidos. É descrito, também, que solos muito ácidos são associados às menores taxa de emissão do gás, uma vez que a metanogênese ocorre melhor em sedimentos com tendência à alcalinidade, com pH variando de 6,0 a 7,0, enquanto valores muito baixos podem inibir a decomposição (Oertel et al. 2016; Hu et al. 2016), o que explicaria porque a alteração no pH utilizada neste estudo não representou variações significativas.

É possível que nas amostras das três espécies em que houve maior emissão de metano durante os primeiros dias (menos para as de *Laguncularia* sp. na menor temperatura) estivesse ocorrendo um estabelecimento das comunidades em relação à fonte de substrato e condições abióticas, uma vez que sofreram perturbações quando retiradas do ambiente natural e durante a montagem dos microcosmos.

Apesar de a emissão de CH₄ ter diminuído drasticamente após os primeiros dias de experimento, os dados de *mcrA* apontam para um aumento de abundância do gene, inclusive estando moderadamente correlacionados com a emissão dos microcosmos contendo *Rhizophora* sp. e *Laguncularia* sp. Isto nos leva a crer que metano pode ter sido produzido, mas não necessariamente emitido, como já descrito na literatura (Mitra et al. 2012), sugerindo que pode ter ocorrido sua subsequente oxidação.

O metano pode ser oxidado aerobiamente, por bactérias, ou sob condições de anaerobiose por arqueias. A oxidação aeróbia é realizada por grupos pertencentes à classe Gammaproteobacteria e associados à presença do gene *pMMO* (Chistoserdova et al. 2005), contudo, verificamos baixa abundância de metanotróficas aeróbias (vide **Diversidade e Composição da Comunidade**), o que nos leva a crer que, se ocorreu oxidação, foi por outra via metabólica.

Em sedimentos de um manguezal semiárido na Baja California Sur (México), foi detectada uma taxa alta de produção de metano, contudo, não foi observada emissão de CH_4 pelos sedimentos. É possível que o metano tenha sido oxidado em condições de aerobiose pelos microrganismos presentes nas camadas superiores dos sedimentos, ou pode ter ocorrido a oxidação sob condições anóxicas, o que geralmente acontece em ambientes salinos e sedimentos marinhos anóxicos (Holguin et al. 2001).

Sabe-se que o *mcrA* é utilizado como marcador para indicar a presença de arqueias metanogênicas (Luton et al. 2002; Friedrich, 2005), como também é um gene relacionado à oxidação anaeróbia do metano (OAM) presente nas ANME (do inglês, *anaerobic methane-oxidizing archaea*; Hallam et al. 2003; Friedrich, 2005; Timmers et al. 2017). É um gene típico na produção de metano e sua ligação ao processo de OAM pode advir de uma divergência evolutiva imposta por adaptações a diferentes habitats, resultando nessa ambiguidade das rotas metabólicas (Hallam, 2004; Zhou et al. 2014).

A metanogênese ocorre nas etapas finais da degradação anaeróbia de matéria orgânica em áreas alagadas, quando não há mais aceptores de elétrons ou quando estes encontram-se limitados. O processo, que pode se dar através da redução de CO_2 , acetato ou compostos metil, envolve a presença da coenzima metil M redutase, que catalisa a síntese do metano (She et al. 2016; Zhou et al. 2014). Em estudo sobre a produção de metano e sua metabolização em manguezais, Zhou (2014) relaciona a presença de *mcrA* tanto em metanogênicas como em ANME e atribui a abundância do gene às altas concentrações de matéria orgânica e baixos valores de E_h .

Como não foi realizado sequenciamento para Archaea, não é possível afirmar quais os grupos mais abundantes ou discernir sobre a estrutura da comunidade metanogênica, contudo, sabe-se que os gêneros mais abundantes na região de procedência do material utilizado no estudo são Methanobacteriales e Methanomicrobiales (Mendes et al. 2012), metanogênicas hidrogenotróficas, ou seja, que reduzem carbono a metano usando H_2 como doador de elétrons.

Em adição à metanogênese, a redução do sulfato também possui um papel importante nas fases finais da decomposição por anaerobiose em manguezais, o que faz das BRS um dos grupos mais abundantes devido às condições proporcionadas pelo ecossistema e que competem com as metanogênicas por substrato (She et al. 2016; Taketani et al. 2010).

Diversos fatores que ajudariam a entender melhor os resultados obtidos não foram mensurados, como potencial redox, condutividade elétrica, salinidade e concentrações de diversos compostos, como SO_4^{2-} , NO_3^- -N, NH_4^+ -N. A concentração elevada de SO_4^{2-} , por

exemplo, pode inibir a emissão de metano, porque estimula as BRS (Hu et al. 2016). A salinidade é outro parâmetro importante na estruturação das comunidades microbianas em manguezais e em altos níveis inibe o desenvolvimento dos grupos metanogênicos (Konnerup et al. 2014; Chauhan et al. 2015).

Em estudo sobre a função da comunidade metanogênica e a influência das propriedades dos sedimentos de manguezal, Arai (2016) aponta a OAM como uma das possíveis causas da redução na produção e emissão de metano em condições de anaerobiose. De acordo com o autor, é possível que a atividade metanogênica tenha sido drasticamente estimulada durante as primeiras semanas de experimento, produzindo grandes quantidades de CH_4 , seguida de um aumento gradual na OAM, ou seja, o aumento de CH_4 estimulou sua oxidação. Por outro lado, a competição de BRS e microrganismos metanogênicos também pode ter inibido a produção de CH_4 .

Em contrapartida, diversos autores sugerem a possibilidade da coexistência de BRS e metanogênicas, desde que haja disponibilidade de matéria orgânica (Taketani et al. 2010; Chauhan et al. 2015; Jing et al. 2016).

Os resultados obtidos no presente estudo apontam um aumento das BRS ao longo do período observado no experimento, contudo, também mostram que, apesar da diminuição na emissão de CH_4 , houve aumento de *mcrA*. Considerando os estudos prévios descritos na literatura, acreditamos que: a) pode ter ocorrido OAM, explicando a abundância de *mcrA* e a queda na emissão do gás; b) a comunidade de metanogênicas do sedimento utilizado seja majoritariamente hidrogenotrófica e seu crescimento foi controlado pelas BRS, reduzindo a emissão de CH_4 . Tal pressuposição suporta os resultados de emissão de CO_2 , que manteve um fluxo constante de emissão, sem taxas elevadas, apesar da degradação da matéria orgânica e c) apesar de ter o gene em abundância, sua transcrição não necessariamente está ocorrendo, devido à competição por substrato.

Quanto à emissão de óxido nitroso, foi observado o mesmo comportamento para todas as espécies vegetais, que não diferiram do controle, indicando que o aporte de matéria orgânica não era o principal fator de estímulo deste processo.

Ao analisar a emissão de GEE e concentrações de carbono e nitrogênio em uma região de mangue na Indonésia, Chen (2014) observou que, apesar de os sedimentos serem ricos em C e N, ocorreu baixa emissão de gases, e atribuiu tais resultados ao alto nível de saturação do solo (menor difusão molecular e decomposição lenta) e ao nível de salinidade, os quais levaram à diminuição na concentração de NO_3^- , causando uma atenuação na desnitrificação e

consequentemente diminuindo a emissão de N_2O . Em outro estudo, Sun (2014) atribui a maior emissão de N_2O aos níveis de umidade e disponibilidade de NH_4^+ .

As emissões de N_2O podem ser muito variadas e estão associadas à presença de elevadas concentrações de nitrogênio (Konnerup et al. 2014). Em nosso caso, devido à falta de diversas informações dos sedimentos, é complicado entender o que ocorreu, mas supomos que a fonte limitada de material orgânico (em se tratando de um microcosmo, sem aporte constante, como no ecossistema) tenha favorecido outros grupos que não os desnitrificantes, principais responsáveis pelo processo de formação de N_2O no ecossistema (Chauhan et al. 2015). Além disso, de acordo com Alongi (2001), a respiração aeróbia e redução do sulfato são os principais mecanismos de oxidação de matéria orgânica em sedimentos de mangue e a desnitrificação é o menor contribuinte para a degradação de matéria orgânica na maioria dos ecossistemas de mangue.

Os microcosmos não representam todas as condições encontradas *in situ* (como mudanças hidrológicas, condições climáticas, etc.). O fluxo de CO_2 , por exemplo, representa apenas a respiração anaeróbica microbiana, a qual é muito diferente do fluxo em campo que é afetado pela respiração da vegetação. Portanto, as medidas obtidas utilizando essa metodologia não são necessariamente a resposta a todos os fatores que afetam as taxas de fluxo de campo, mas são úteis para estudar potenciais efeitos dos fatores ambientais nas emissões de gases (Brooker et al. 2014).

7.3. Diversidade e Composição da Comunidade

A comunidade bacteriana para as três espécies vegetais estudadas foi majoritariamente composta por Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Clostridia e Actinobacteria, evidenciando a dominância dos filos Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria nos sedimentos do ecossistema, como demonstrado previamente em outros estudos (Dias et al. 2010; Andreote et al. 2012; Varon-Lopez et al. 2013; Mendes et al. 2014; Basak et al. 2015; Wu et al. 2016).

A baixa abundância de grupos metanotróficos condiz com os resultados encontrados por Andreote (2012), que, ao estudar o microbioma dos sedimentos provenientes da mesma floresta de mangue, relatou a incidência de poucos genes associados à metanotrofia.

Embora nem todos os índices de diversidade tenham apontado variação significativa ocorrendo pela influência do tempo para as amostras de *Rhizophora* sp. e *Avicennia* sp.,

verificou-se aumento do número de OTUs observadas entre o 3º e 45º dia de experimento. Em estudo conduzido em microcosmos, Xu (2013) observou aumento na α diversidade ao final do período observado e concebeu o comportamento à alteração da qualidade da serapilheira, a qual diminuiu a disponibilidade de carbono em forma de açúcares e amido, enquanto ocorria um aumento do carbono recalcitrante (ligninas e fenóis). Assim, acompanhando as alterações da matéria orgânica, os microrganismos decompositores também variaram. Da mesma forma, Moitinho (2016) encontrou comportamento similar no aumento da α diversidade ao final do experimento, condizendo com nossos resultados.

Para *Laguncularia* sp., observou-se o mesmo comportamento evidenciado para as outras espécies vegetais, não apenas para o tempo, como para a temperatura, sendo inclusive apontado por todos os índices. Ou seja, não houve apenas aumento na abundância numérica, mas na filogenética, baseada na presença ou ausência de espécies (Cadotte et al. 2010). Esses resultados coincidem com os encontrados para a composição da comunidade, em que se verificou maior abundância de Gammaproteobacteria nos estágios iniciais na temperatura elevada e maior incidência de Actinobacteria a 27,5°C (Figura 20). Acreditamos que a influência da temperatura tenha se dado principalmente em função da sua ação sobre o material orgânico e conseqüentemente tenha favorecido a colonização para determinados grupos (Gammaproteobacteria e Actinobacteria a 29,5°C e 27,5°C, respectivamente).

Sabe-se que as comunidades que compõem a filosfera das três espécies vegetais estudadas diferem entre si (Dias et al., 2012b). Contudo, apesar dos grupos microbianos que colonizam a superfície do material vegetal antes deste entrar em contato com os sedimentos serem considerados um fator de influência nos processos de decomposição, não é necessariamente o elemento mais significativo em afetar as comunidades microbianas decompositoras. Dessa forma, embora diferentes grupos colonizem as folhas de acordo com os níveis de C:N disponíveis e por eles requeridos, as comunidades mais específicas e responsáveis pela decomposição estão presentes nos sedimentos e colonizam as folhas após a sua queda, por isso, a qualidade do material representa um papel chave nos estágios iniciais de decomposição (Xu et al. 2013) e evidencia a importância e influência da matéria orgânica, constatando nossos resultados.

Dias (2010), em estudo sobre a diversidade em sedimentos de manguezal coletados na mesma área de estudo do presente trabalho, aponta que os grupos dominantes são mais sensíveis aos fatores ambientais do que as comunidades que ocorrem em menor densidade e que por sua vez têm menor capacidade de resposta. Apesar de os grupos dominantes indicados

pelo autor pertencerem à classe das Alphaproteobacteria (e menor incidência a Betaproteobacteria e Actinobacteria) e os nossos resultados terem apontado para as Gammaproteobacteria como a classe mais abundante em todas as plantas, é possível aplicar a mesma premissa, principalmente considerando a ação do tempo.

O processo de sucessão ao longo da decomposição foi evidente, principalmente partindo das Análises de Coordenadas Principais baseadas no índice de Bray-Curtis, em que foi possível evidenciar o comportamento e incidência da comunidade nos diferentes períodos de tempo, com a formação de agrupamentos de maior dissimilaridade entre os períodos iniciais e finais. As mesmas análises a nível taxonômico de “ordem” permitiram observar os principais grupos associados durante a alteração na estrutura da comunidade, sendo notório o aumento da abundância de Chromatiales, Clostridiales e principalmente Desulfobacterales nos estágios finais.

Na ordem das Desulfobacterales, estão incluídos os principais grupos exclusivos de bactérias redutoras de sulfato, e sua incidência era esperada conforme estudos prévios descritos na literatura, principalmente nos estágios mais avançados do processo de decomposição (Taketani et al. 2010; Dias et al. 2012a; Andreote et al. 2012; Varon-Lopez et al. 2013; Mishra et al. 2012).

O ecossistema manguezal favorece condições para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios, como as BRS, que utilizam substratos mais complexos (como cadeias longas e hidrocarbonetos aromáticos) e de metanogênicas, que utilizam substratos mais simples (Andreote et al. 2012). A classe das Deltaproteobacteria, a qual engloba as ordens Desulfobacterales e Desulfovibrionales, foi anteriormente descrita como o grupo mais abundante associado com a transformação do enxofre no mangue (Varon-Lopez et al. 2013), assim como em nosso trabalho.

Além disso, a presença do gene *nifH*, associado à fixação de N_2 , já foi relatada em grupos de BRS e em *Clostridium* (Dias et al. 2012a), fato que pode ter relação com a baixa emissão de N_2O em nossas amostras e que sustenta a suposição sugerida para as emissões de CH_4 . Ainda, no período final de análise, verificou-se a presença de Chromatiales, grupo característico de ambientes salinos e anaeróbios associado ao ciclo do enxofre, com crescimento preferencial em meio aquoso e temperaturas elevadas (Madigan et al. 2015), o que explicaria sua maior incidência na temperatura de incubação a 29,5°C independentemente da procedência do material vegetal.

Apesar de as PCoA baseadas na distância UniFrac terem apresentado comportamento por ordenação diferente ao de Bray-Curtis, mostrando maior similaridade entre os grupos

independente do tempo de análise, elas permitiram verificar a alteração na estrutura da comunidade, relacionando maior agrupamento e incidência de Chromatiales e Desulfobacterales ao final do experimento. Esse tipo de ordenação provavelmente se deve ao fato das comunidades envolvidas no processo de decomposição pertencerem majoritariamente aos mesmos grupos filogenéticos e, conseqüentemente, com menor distância filogenética entre si (Wong et al. 2016).

Por outro lado, a análise de PERMANOVA não indicou alterações na comunidade provocadas pelos tratamentos utilizados. Em um estudo sobre os efeitos da temperatura e conteúdo de água no solo na comunidade bacteriana e de arqueias, Stres (2008) constatou que a comunidade de arqueias foi mais suscetível a alterações na temperatura do que a comunidade bacteriana, que se manteve estável independente dos tratamentos. O autor concluiu que, em solos com alto conteúdo de carbono, as variações na temperatura e umidade (“mudanças sazonais”) não foram fortes o suficiente para alterar significativamente a estrutura da comunidade, e apontou que a ausência de alterações em níveis taxonômicos elevados pode ser resultante da alta diversidade e redundância, propondo que alterações de comunidade possam ser mais aparentes em grupos envolvidos em processos específicos.

Além disso, solos com alto conteúdo de carbono são capazes de manter a uniformidade nos padrões da comunidade, independente do estado de saturação e de mudanças sazonais (Zhou et al. 2002), condições similares às encontradas em nosso experimento, principalmente no que diz respeito ao alto teor de carbono orgânico disponível. Ainda, como já dito anteriormente, as variações utilizadas no presente trabalho foram “amenas” e se encontram na faixa das mudanças pelas quais as comunidades são submetidas ao longo do ano. Sendo assim, da mesma forma que para as outras análises feitas, acreditamos que as mudanças aplicadas não tenham sido bruscas ao ponto de ter força sobre a estrutura da comunidade.

O pH foi relatado como sendo um dos principais fatores abióticos que explica e influência na composição e distribuição das comunidades microbianas em manguezais (Chen et al. 2016; Mendes et al. 2014; Mishra et al. 2012; Liu et al. 2015; Bai et al. 2017). No entanto, nos estudos descritos, o pH variava ao longo de transeptos verticais (profundidade) ou horizontais (sucessão partindo da zona entre marés até a floresta), e a variação nos valores era maior do que a aplicada em nossos tratamentos.

Embora o pH seja uma das características mais representativas do solo e que atua como condutor na estruturação da comunidade bacteriana e de arqueias, ele depende de diversos fatores e sua ação nem sempre se dá de forma direta, mas através da influência de

outras características que atuam sobre a comunidade (Liu et al. 2015; Bai et al. 2017). Partindo dessa premissa e das considerações feitas anteriormente para essa variável, supomos que a acidificação da água, do modo que foi efetuada, não teve força para provocar alterações não apenas sobre a comunidade, como sobre o material orgânico.

Apesar da ausência de variações significativas em função do efeito do pH, verificamos que houve maior abundância dos grupos de Alpha e Betaproteobacteria nas amostras incubadas em meio mais ácido, coincidindo com o fato desses grupos serem geralmente considerados indicadores de baixos valores de pH, uma vez que seu desempenho metabólico e taxa de crescimento são favorecidos em meio mais ácido (Krause et al. 2012; Lv et al. 2016), o que nos leva a presumir que mudanças mais drásticas na acidificação e na maneira como foram ocasionadas podem provocar alterações em grupos de maior suscetibilidade específica para esse fator ambiental.

Independente da importância e influência dos fatores abióticos ambientais sobre a abundância, distribuição e conformação das comunidades microbianas, deve-se considerar sua plasticidade e o alto potencial de adaptação, uma vez que a diversidade microbiana é altamente responsiva às mudanças nas condições ambientais, posto que tem que se adaptar às modificações constantemente impostas pelo ecossistema sem perder sua função dentro dele (Holguin et al. 2006).

8. CONCLUSÃO

Ao avaliar a dinâmica da diversidade microbiana sob alterações das condições climáticas, os resultados apontaram que o fator determinante para a colonização de material orgânico foi a origem do material vegetal, provavelmente em razão da composição química e relação C:N. A sucessão temporal foi claramente perceptível, coincidindo com estudos prévios quanto à alteração da qualidade e composição da serapilheira e sua relação com a colonização por decompositores.

As mudanças na temperatura e pH não tiveram força para influenciar a diversidade e composição das comunidades microbianas, resultado que atribuímos a resistência e elevada capacidade de adaptação das comunidades presentes nos sedimentos de mangue, uma vez que são expostas a rígidas condições ambientais que variam constantemente. Além disso, o aumento da temperatura e acidificação da água impostos estavam dentro da faixa de variação à qual o ecossistema normalmente é submetido. Consequentemente não evidenciamos alteração na degradação do material lignocelulósico em função dos tratamentos. Isto, além de considerar que os resultados obtidos foram gerados em experimento conduzido em laboratório, não havendo interferência de diversos fatores encontrados no campo.

Em contrapartida, demonstramos que a presença do gene *mcrA* teve relação moderada com a emissão de metano em amostras de *Rhizophora* sp. e *Laguncularia* sp., demonstrando que a comunidade de Archaea é mais suscetível a alterações ambientais do que a de Bacteria. O aumento de grupos associados às BRS, tais como Desulfobacterales e Desulfovibrionales provavelmente está relacionado à baixa emissão de metano e indica uma relação de coexistência entre as comunidades, uma vez que verificou-se um aumento de *mcrA*, mesmo que com baixa emissão de CH₄.

O presente estudo evidenciou a ampla complexidade nas relações estabelecidas pelas comunidades microbianas em manguezais, e mostra a necessidade de estudos com a mesma abordagem, para que o efeito de alterações ambientais possa ser melhor entendido e compreender desse modo o impacto que têm sob os ciclos biogeoquímicos e sua repercussão a nível global.

REFERÊNCIAS

- Ahila, N. K., Kannapiran, E., Ravindran, J., & Ramkumar, V. S. (2014). Onl Onl Cop, 35(July), 649–654.
- Aké-Castillo, J. A., Vázquez, G., & López-Portillo, J. (2006). Litterfall and decomposition of *Rhizophora mangle* L. in a coastal lagoon in the southern Gulf of Mexico. *Hydrobiologia*, 559(1), 101–111. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-0959-x>
- Allen, D. E., Dalal, R. C., Rennenberg, H., Meyer, R. L., Reeves, S., & Schmidt, S. (2007). Spatial and temporal variation of nitrous oxide and methane flux between subtropical mangrove sediments and the atmosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2), 622–631. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.09.013>
- Allen, D., Dalal, R. C., Rennenberg, H., & Schmidt, S. (2011). Seasonal variation in nitrous oxide and methane emissions from subtropical estuary and coastal mangrove sediments, Australia. *Plant Biology*, 13(1), 126–133. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00331.x>
- Alongi, D. M., Wattayakorn, G., Pfitzner, J., Tirendi, F., Zagorskis, I., Brunskill, G. J., Davidson, A., Clough, B. F. (2001). Organic carbon accumulation and metabolic pathways in sediments of mangrove forest in southern Thailand. *Marine Geology*, 85–103. [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-3227\(01\)00195-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-3227(01)00195-5)
- Alongi, D. M. (2002). Present state and future of the world's mangrove forests. *Environ.Conserv.*, 29(3), 331–349. <https://doi.org/10.1017/S0376892902000231>
- Alongi, D. M. (2007). Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.08.024>
- Alongi, D. M. (2009). Paradigm shifts in Mangrove Biology. *Coastal Wetlands: An Integrated Ecosystem Approach*, p. 615– 640.
- Alves, J. R. P. (2001). Manguezais: educar para proteger. Rio de Janeiro: FEMAR:SEMADS, 96 p.
- Andreote, F. D., Jiménez, D. J., Chaves, D., Dias, A. C. F., Luvizotto, D. M., Dini-Andreote, F., ... de Melo, I. S. (2012). The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038600>
- Arai, H., Yoshioka, R., Hanazawa, S., Minh, V. Q., Tuan, V. Q., Tinh, T. K., ... Inubushi, K. (2016). Function of the methanogenic community in mangrove soils as influenced by the chemical properties of the hydrosphere. *Soil Science and Plant Nutrition*, 62(2), 150–163. <https://doi.org/10.1080/00380768.2016.1165598>
- Araújo, D. S. D., Maciel, N. C. (1979). Os Manguezais do Recôncavo da Baía de Guanabara. FEEMA, v. 10.
- Bai, R., Wang, J. T., Deng, Y., He, J. Z., Feng, K., & Zhang, L. M. (2017). Microbial community and functional structure significantly varied among distinct types of paddy soils but responded differently along gradients of soil depth layers. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00945>

- Ball, M. C., Cochrane, M. J., Rawson, H. M. (1997). Growth and water use of the mangroves *Rhizophora apiculata* and *R. stylosa* in response to salinity and humidity under ambient and elevated concentrations of atmospheric CO₂. *Plant, Cell and Environment*, 20, 1158–1166.
- Basak, P., Pramanik, A., Roy, R., Chattopadhyay, D., & Bhattacharyya, M. (2015). Cataloguing the bacterial diversity of the Sundarbans mangrove, India in the light of metagenomics. *Genomics Data*, 4, 90–92. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.03.014>
- Basak, P., Pramanik, A., Sengupta, S., Nag, S., Bhattacharyya, A., Roy, D., ... Bhattacharyya, M. (2016). Bacterial diversity assessment of pristine mangrove microbial community from Dhulibhashani, Sundarbans using 16S rRNA gene tag sequencing. *Genomics Data*, 7, 76–78. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.11.030>
- Bauza, J. F., Morell, J. M., & Corredor, J. E. (2002). Biogeochemistry of Nitrous Oxide Production in the Red Mangrove (*Rhizophora mangle*) Forest Sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55(5), 697–704. <https://doi.org/10.1006/ecss.2001.0913>
- Benner, R., & Hodson, R. (1985a). Microbial degradation of the leachable and lignocellulosic components of leaves and wood from *Rhizophora mangle* in a tropical mangrove swamp. *Marine Ecology Progress Series*, 23(Crawford 1981), 221–230. <https://doi.org/10.3354/meps023221>
- Benner, R., Moran, M. A., & Hodson, R. E. (1985b). Effects of pH and plant source on lignocellulose biodegradation rates in two wetland ecosystems, the Okefenokee Swamp and a Georgia salt marsh. *Limnology and Oceanography*, 30(3), 489–499. <https://doi.org/10.4319/lo.1985.30.3.0489>
- Benner, R., Peele, E. R., Hodson, R. (1986). Microbial Utilization of Dissolved Organic Matter from Leaves of the Red Mangrove, *Rhizophora mangle*, in the Fresh Creek Estuary, Bahamas. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 23: 607–619.
- Bott, R. (2014). *Climate Change 2014 Impacts, Adaptation, and Vulnerability Part B: Regional Aspects. Igarss 2014*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Brooker, M. R., Bohrer, G., & Mouser, P. J. (2014). Variations in potential CH₄ flux and CO₂ respiration from freshwater wetland sediments that differ by microsite location, depth and temperature. *Ecological Engineering*, 72, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.05.028>
- Cadotte, M. W., Jonathan Davies, T., Regetz, J., Kembel, S. W., Cleland, E., & Oakley, T. H. (2010). Phylogenetic diversity metrics for ecological communities: Integrating species richness, abundance and evolutionary history. *Ecology Letters*, 13(1), 96–105. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01405.x>
- Caporaso, J. G., Bittinger, K., Bushman, F. D., DeSantis T. Z., Andersen G. L. (2010). PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics*, 15 (26), 266–267. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp636>
- Chauhan, R., Datta, A., Ramanathan, A., & Adhya, T. K. (2015). Factors influencing spatio-temporal variation of methane and nitrous oxide emission from a tropical mangrove of eastern coast of India. *Atmospheric Environment*, 107, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.02.006>

- Chen, G. C., Tam, N. F. Y., & Ye, Y. (2010). Summer fluxes of atmospheric greenhouse gases N₂O, CH₄ and CO₂ from mangrove soil in South China. *Science of the Total Environment*, 408(13), 2761–2767. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.007>
- Chen, G. C., Tam, N. F. Y., & Ye, Y. (2012). Spatial and seasonal variations of atmospheric N₂O and CO₂ fluxes from a subtropical mangrove swamp and their relationships with soil characteristics. *Soil Biology and Biochemistry*, 48(December), 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.01.029>
- Chen, G. C., Ulumuddin, Y. I., Pramudji, S., Chen, S. Y., Chen, B., Ye, Y., ... Wang, J. K. (2014). Rich soil carbon and nitrogen but low atmospheric greenhouse gas fluxes from North Sulawesi mangrove swamps in Indonesia. *Science of the Total Environment*, 487(1), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.140>
- Chen, Q., Zhao, Q., Li, J., Jian, S., & Ren, H. (2016). Mangrove succession enriches the sediment microbial community in South China. *Scientific Reports*, 6(May), 27468. <https://doi.org/10.1038/srep27468>
- Chistoserdova, L., Vorholt, J. A., & Lidstrom, M. E. (2005). A genomic view of methane oxidation by aerobic bacteria and anaerobic archaea. *Genome Biology*, 6(2), 208. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-2-208>
- Cunha-Lignon, M., Coelho-Jr, C., Almeida, R., Menghini, R., Correa, F., Schaeffer-Novelli, Y., ... Dahdouh-Guebas, F. (2009). Mangrove Forests and Sedimentary Processes on the South Coast of São Paulo State (Brazil). *Journal of Coastal Research*, 2009(56), 405–409. Retrieved from <http://biblioteca.versila.com/2328981>
- Cunha-Lignon, M., Coelho Jr., C., Almeida, R., Menghini, R. P., Schaeffer-Novelli, Y., Cintrón, G., & Dahdouh-Guebas, F. (2011). Characterisation of mangrove forest types in view of conservation and management: a review of mangals at the Cananéia region, São Paulo State, Brazil. *Journal of Coastal Research*, 64(57), 349–353.
- De Klein, J. J. M., & Van der Werf, A. K. (2014). Balancing carbon sequestration and GHG emissions in a constructed wetland. *Ecological Engineering*, 66, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.04.060>
- Dias, A. C. F., Andreote, F. D., Rigonato, J., Fiore, M. F., Melo, I. S., & Araújo, W. L. (2010). The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 98(4), 541–551. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9471-z>
- Dias, A. C. F., Pereira e Silva, M. de C., Cotta, S. R., Dini-Andreote, F., Soares, F. L., Salles, J. F., ... Andreote, F. D. (2012a). Abundance and genetic diversity of nifH gene sequences in anthropogenically affected Brazilian Mangrove sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(22), 7960–7967. <https://doi.org/10.1128/AEM.02273-12>
- Dias, A. C. F., Taketani, R. G., Andreote, F. D., Luvizotto, D. M., da Silva, J. L., Nascimento, R. dos S., & de Melo, I. S. (2012b). Interspecific variation of the bacterial community structure in the phyllosphere of the three major plant components of mangrove forests. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(2), 653–660. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200030>

- Dickson, A. G., Sabine, C. L., & Christian, J. R. (2007). Guide to best practices for ocean CO₂ measurements. *PICES Special Publication* 3, 3(8), 191. <https://doi.org/10.1159/000331784>
- Dittmar, T., Hertkorn, N., Kattner, G., & Lara, R. J. (2006). Mangroves, a major source of dissolved organic carbon to the oceans. *Global Biogeochemical Cycles*, 20(1), 1–7. <https://doi.org/10.1029/2005GB002570>
- Duke, N. C., Ball, M. C., & Ellison, J. C. (1998). Factors Influencing Biodiversity and Distributional Gradients in Mangroves. *Global Ecology and Biogeography Letters*, 7(1), 27–47. <https://doi.org/10.2307/2997695>
- Duke, N. C., Meynecke, J. O., Dittmann, S., Ellison, A. M., Anger, K., Berger, U., Cannicci, S., Diele, K., ... A World Without Mangroves? *Science*, 317(July), 41–43. <https://doi.org/10.1126/science.317.5834.41b>
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460–2461. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Ferreira, A. C., & Lacerda, L. D. (2016). Degradation and conservation of Brazilian mangroves, status and perspectives. *Ocean and Coastal Management*, 125, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2016.03.011>
- Fierer, N., Nemergut, D., Knight, R., & Craine, J. M. (2010). Changes through time: Integrating microorganisms into the study of succession. *Research in Microbiology*, 161(8), 635–642. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.06.002>
- Friedrich, M. W. (2005). Methyl-coenzyme M reductase genes: Unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing Archaea. *Methods in Enzymology*, 397(5), 428–442. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)97026-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)97026-2)
- Fuhrman, J. A., Cram, J. A., & Needham, D. M. (2015). Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nature Reviews Microbiology*, 13(3), 133–146. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3417>
- Gessner, M. O., Chauvet, E., & Dobson, M. (1999). A perspective on leaf litter breakdown in streams (review). *Oikos*, 85(2), 377–384. <https://doi.org/10.2307/3546505>
- Giri, C., Ochieng, E., Tieszen, L. L., Zhu, Z., Singh, A., Loveland, T., ... Duke, N. (2011). Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Global Ecology and Biogeography*, 20(1), 154–159. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00584.x>
- Godoy, S. A. P., Mayworm, M. A. S., Kurt, V., Salatino, A., Schaeffer-Novelli, Y. (1997). Teores de ligninas, nitrogênio e taninos em folhas de espécies típicas do mangue. *Revista Brasileira de Botânica*, 20 (1), 35–40.
- Hallam, S. J., Girguis, P. R., Preston, C. M., Richardson, P. M., & DeLong, E. F. (2003). Identification of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5483–5491. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5483-5491.2003>
- Hallam, S. J. (2004). Reverse Methanogenesis: Testing the Hypothesis with Environmental Genomics. *Science*, 305(5689), 1457–1462. <https://doi.org/10.1126/science.1100025>
- Holguin, G., Vazquez, P., Bashan, Y. (2001). The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: An overview. *Biology and Fertility of Soils*, 33(4), 265–278. <https://doi.org/10.1007/s003740000319>

- Holguin, G., Zamorano, P. G., deBashan, L. E., Mendoza, R., Amador, E., Bashan, Y. (2006). Mangrove health in an arid environment enroached by urban development - a case study. *Science of the Total Environment*, 363: 260-274. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.05.026>
- Hossain, M. D., Nuruddin, A. A. (2015). Soil and Mangrove: A Review. *Journal of Environmental Science and Technology*, 9: 198-207. <http://doi.org/10.3923/jest.2016.198.207>
- Hu, M., Ren, H., Ren, P., Li, J., Wilson, B. J., & Tong, C. (2016). Response of gaseous carbon emissions to low-level salinity increase in tidal marsh ecosystem of the Min River estuary, southeastern China. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 52, 210–222. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.05.009>
- IPCC, 2013: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.
- IPCC, 2014a: *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part B: Regional Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Barros, V.R., C.B. Field, D.J. Dokken, M.D. Mastrandrea, K.J. Mach, T.E. Bilir, M. Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea, and L.L. White (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 688.
- IPCC, 2014b: *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J. Mach, M.D. Mastrandrea, T.E. Bilir, M. Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea, and L.L. White (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1132 pp.
- Jantalia, C. P., Santos, H. P., Urquiaga, S., Boddey, R. M., Alves, B. J. R. (2008.)Fluxes of nitrous oxide from soil under different crop rotations and systems in the south of Brazil. *Nutrient Cycling and Agroecosystems*, 82:161-173,
- Jennerjahn, T. C., & Ittekkot, V. (2002). Relevance of mangroves for the production and deposition of organic matter along tropical continental margins. *Naturwissenschaften*, 89(1), 23–30. <https://doi.org/10.1007/s00114-001-0283-x>
- Jing, H., Cheung, S., Zhou, Z., Wu, C., Nagarajan, S., & Liu, H. (2016). Spatial variations of the methanogenic communities in the sediments of tropical mangroves. *PLoS ONE*, 11(9), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161065>
- Kathiresan, K., & B. L. Bingham. (2001). Biology of mangrove and mangrove ecosystems. *Advances in Marine Biology*, 40, 81–251.
- Killmann, W. (2007). The world's mangroves 1980-2005. A thematic study prepared in the framework of the Global Forest Resources Assessments 2005. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome.

- Klein, J. J. M., Werf, A. K. (2014). Balancing carbon sequestration and GHG emissions in a constructed wetland. *Ecological Engineering*, 66: 36-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.04.060>
- Konnerup, D., Betancourt-Portela, J. M., Villamil, C., & Parra, J. P. (2014). Nitrous oxide and methane emissions from the restored mangrove ecosystem of the Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 140(January), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.01.006>
- Krause, E., Wichels, A., Giménez, L., Lunau, M., Schilhabel, M. B., & Gerds, G. (2012). Small Changes in pH Have Direct Effects on Marine Bacterial Community Composition: A Microcosm Approach. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047035>
- Kristensen, E., Bouillon, S., Dittmar, T., & Marchand, C. (2008). Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: A review. *Aquatic Botany*, 89(2), 201–219. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.12.005>
- Leopold, A., Marchand, C., Deborde, J., & Allenbach, M. (2015). Temporal variability of CO₂ fluxes at the sediment-air interface in mangroves (New Caledonia). *Science of the Total Environment*, 502, 617–626. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.066>
- Lozupone, C., Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8228-8235. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>
- Liu, S., Ren, H., Shen, L., Lou, L., Tian, G., Zheng, P., & Hu, B. (2015). pH levels drive bacterial community structure in the Qiantang River as determined by 454 pyrosequencing. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00285>
- Lunstrum, A., & Chen, L. (2014). Soil carbon stocks and accumulation in young mangrove forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 75, 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.04.008>
- Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J., & Riley, P. W. (2002). The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology*, 148(11), 3521–3530. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3521>
- Lv, X., Ma, B., Yu, J., Chang, S. X., Xu, J., Li, Y., ... Chu, X. (2016). Bacterial community structure and function shift along a successional series of tidal flats in the Yellow River Delta. *Scientific Reports*, 6(November), 36550. <https://doi.org/10.1038/srep36550>
- Mackenzie, F. T., Vink, S., Wollast, R., Chou, L. (1995). Chapter 9: Comparative Geochemistry of Marine Saline Lakes. *Physics and Chemistry of Lakes. 2nd edition*. Springer-Verlag, Berlin, 265-278.
- Mackey, A. P., & Smail, G. (1996). The decomposition of mangrove litter in a subtropical mangrove forest. *Hydrobiologia*, 332(2), 93–98. <https://doi.org/10.1007/BF00016688>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A. (2015). Brock Biology of Microorganisms. *Pearson: Chicago, 14th edition*. p.1006
- Magris, R. A., Barreto, R. (2010). Mapping and assessment of protection of mangrove habitats in Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 5(4), 546–556.

- McMurdie, P. J., Susan H. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4):e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mendes, L. W., Taketani, R. G., Navarrete, A. A., & Tsai, S. M. (2012). Shifts in phylogenetic diversity of archaeal communities in mangrove sediments at different sites and depths in southeastern Brazil. *Research in Microbiology*, 163(5), 366–377. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.05.005>
- Mendes, L. W., & Tsai, S. M. (2014). Variations of bacterial community structure and composition in mangrove sediment at different depths in Southeastern Brazil. *Diversity*, 6(4), 827–843. <https://doi.org/10.3390/d6040827>
- Mendiburu, F. (2017). agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.2-6. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Mendonça, J. R. A. (2006). Taxas de decomposição das folhas de *Rhizophora*, *Avicennia* e *Laguncularia* no Furo Grande, Bragança - Pará. **Tese de Me.** 54.
- Mesquita, A.L., Harari. (1983). Tides and gauges of Cananeia and Ubatuba – Brasil (Lat. 24°). *Relat. Int. Inst. Oceanogr. Univ. S. Paulo*, 11:1-14.
- Mfilinge, P. L., & Tsuchiya, M. (2008). Effect of temperature on leaf litter consumption by grapsid crabs in a subtropical mangrove (Okinawa, Japan). *Journal of Sea Research*, 59(1–2), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2007.07.004>
- Mishra, R. R., Swain, M. R., Dangar, T. K., & Thatoi, H. (2012). Diversity and seasonal fluctuation of predominant microbial communities in Bhitarkanika, a tropical mangrove ecosystem in India. *Revista de Biologia Tropical*, 60(2), 909–924.
- Mitra, S., Majumdar, D., & Wassmann, R. (2012). Methane production and emission in surface and subsurface rice soils and their blends. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 158, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.05.021>
- Moitinho, M. A. (2016). Avaliação da Sucessão Ecológica de Comunidades Microbianas em Matéria Orgânica Vegetal em Decomposição em Manguezais do Estado de São Paulo. Piracicaba, SP. **Tese de Me.** 72.
- Naidoo, G. (2016). The mangroves of South Africa: An ecophysiological review. *South African Journal of Botany*, 107, 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.04.014>
- Nóbrega, G. N., Ferreira, T. O., Siqueira Neto, M., Queiroz, H. M., Artur, A. G., Mendonça, E. D. S., ... Otero, X. L. (2016). Edaphic factors controlling summer (rainy season) greenhouse gas emissions (CO₂ and CH₄) from semiarid mangrove soils (NE-Brazil). *Science of the Total Environment*, 542, 685–693. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.108>
- Oertel, C., Matschullat, J., Zurba, K., Zimmermann, F., & Erasmi, S. (2016). Greenhouse gas emissions from soils—A review. *Chemie Der Erde - Geochemistry*, 76(3), 327–352. <https://doi.org/10.1016/j.chemer.2016.04.002>
- Oksanen J., Blanchet F. G., Friendly M., Kindt R., Legendre P., McGlinn D., Peter R. Minchin P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Henry, M., Stevens, H., Szoecs, E., Wagner, H. (2017). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.4-3. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Oliveira, A. B. (2010). Decomposição das Folhas de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* em um Manguezal de Ilheús, Bahia. **Tese de Me.** 53.

- Olson, J. S. (1963). Energy Storage and the Balance of Producers and Decomposers in Ecological Systems. *Ecological Society of America*, 44(2), 322-331. <http://www.jstor.org/stable/1932179>
- Polidoro, B. A., Kent, E. C., Lorna, C., Norman, C. D., Aaron, M. E., Joanna, C. E. (2010). The loss of species: Mangrove extinction risk and geographic areas of global concern. *PLoS ONE* 5(4), 1-10, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010095>
- Purvaja, R., Ramesh, R., & Frenzel, P. (2004). Plant-mediated methane emission from an Indian mangrove. *Global Change Biology*, 10(11), 1825-1834. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2004.00834.x>
- Price, M. N., Dehal, P.S., Arkin, A. P. (2009). FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 26(7), 1641-1650. <http://doi.org/10.1093/molbev/msp077>
- Rastogi, G., Sani, R. K. (2011). Chapter 2: Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function and Dynamics in the Environment. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*, 29-57. http://doi.org/10.1007/978-1-4419-7931-5_2
- Reef, R., Feller, I. C., & Lovelock, C. E. (2010). Nutrition of mangroves. *Tree Physiology*, 30(9), 1148-1160. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq048>
- Rezende, R. de S., Pinto, M. de O., Gonçalves Jr, J. F., & Petrucio, M. M. (2013). The effects of abiotic variables on detritus decomposition in Brazilian subtropical mangroves. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 25(2), 158-168. <https://doi.org/10.1590/s2179-975x2013000200007>
- Riebesell, U., Fabry, V. J., Hansson, L., & Gattuso, J.-P. (2010). *Guide to Best Practices in Ocean Acidification Research and Data Reporting. Report of international research workshop on best practices for ocean acidification research (19-21 November 2008 in Kiel, Germany)*. <https://doi.org/10.2777/58454>
- Rigonato, J., Kent, A. D., Gumiere, T., Branco, L. H. Z., Andreote, F. D., & Fiore, M. F. (2017). Temporal assessment of microbial communities in soils of two contrasting mangroves. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.04.008>
- Robertson, A. I. (1988). Decomposition of mangrove leaf litter in tropical Australia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 116(3), 235-247. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(88\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0022-0981(88)90029-9)
- Rocha, L. L., Colares, G. B., Nogueira, V. L. R., Paes, F. A., & Melo, V. M. M. (2016). Distinct Habitats Select Particular Bacterial Communities in Mangrove Sediments. *International Journal of Microbiology*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3435809>
- Saenger, (1983). *Global Status of Mangrove Ecosystems*. v. 3.
- Schaeffer-Novelli, Y., Cintrón-Molero, G., & Adaime, R. R. (1990). Variability of Mangrove Ecosystems along the Brazilian Coast Variability of Mangrove Ecosystems Along the Brazilian Coast. *Estuaries*, 13(2), 204-218.
- Schaeffer-Novelli, Y., Cintrón-Molero, G., Soares, M. L. G., Rosa, T. (2000). Brazilian mangroves. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 3 (4), 561-570.

- She, C. X., Zhang, Z. C., Cadillo-Quiroz, H., Tong, C. (2016). Factors regulating community composition of methanogens and sulfate-reducing bacteria in brackish marsh sediments in the Min River Estuary, Southeastern China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. <http://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.08.003>.
- Sinclair, L. (2016). *Molecular methods for microbial ecology*. *Science and Technology*. Retrieved from <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:942529/FULLTEXT01.pdf>
- Sogin, M. L. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Welch, D. M., Huse, S. M., Neal, P. R., Arriera, J. M., Herndl, G. J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored 'rare biosphere'. *Proc. Natl. Acad. Science*, 103(32), 12115-12120. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605127103>
- Steinberg, L. M., Regan, J. M. (2008). Phylogenetic Comparison of the Methanogenic Communities form an Acidic Oligotrophic Fen and an Anaerobic Digester Treating Municipal Wastewater Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6663-6671. <http://doi.org/10.1128/AEM.00553-08>
- Steinke, T. D., & Charles, L. M. (1986). In vitro rates of decomposition of leaves of the mangrove *Bruguiera gymnorrhiza* affected by temperature and salinity. *Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Plantkunde*, 52(1), 39–42. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(16\)31599-X](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(16)31599-X)
- Stres, B., Danevcic, T., Pal, L., Fuka, M. M., Resman, L., Leskovec, S., ... Mandic-Mulec, I. (2008). Influence of temperature and soil water content on bacterial, archaeal and denitrifying microbial communities in drained fen grassland soil microcosms. *FEMS Microbiol Ecol*, 66(1), 110–122. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00555.x>
- Sun, Z., Wang, L., Mou, X., Jiang, H., & Sun, W. (2014). Spatial and temporal variations of nitrous oxide flux between coastal marsh and the atmosphere in the Yellow River estuary of China. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(1), 419–433. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1885-5>
- Taketani, R. G., Yoshiura, C. A., Dias, A. C. F., Andreote, F. D., & Tsai, S. M. (2010). Diversity and identification of methanogenic archaea and sulphate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 97(4), 401–411. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9422-8>
- Tam, N. F. Y., Li, S. H., Lan, C. Y., Chen, G. Z., Li, M. S., & Wong, Y. S. (1995). Nutrients and heavy metal contamination of plants and sediments in Futian mangrove forest. *Hydrobiologia*, 295(1–3), 149–158. <https://doi.org/10.1007/BF00029122>
- Thatoi, H., Behera, B. C., Mishra, R. R., & Dutta, S. K. (2013). Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: A review. *Annals of Microbiology*, 63(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0442-7>
- Thom, B.G. (1984). The mangrove ecosystem: research methods. The mangrove ecosystem: research methods. Monographs on oceanographic methodology (ed. by S.C. Snedaker and J.G. Snedaker), UNESCO, Paris, 3 -15.
- Timmers, P. H. A., Welte, C. U., Koehorst, J. J., Plugge, C. M., Jetten, M. S. M., & Stams, A. J. M. (2017). Reverse Methanogenesis and Respiration in Methanotrophic Archaea. *Archaea*, 2017(Figure 1). <https://doi.org/10.1155/2017/1654237>

- Twilley, R. R., Sneadaker, S.C., Arancibia, A. Y., Medina, E. (1996). Biodiversity and Ecosystem Processes in Tropical Estuaries: Perspectives of Mangrove Ecosystems. *Functional Roles of Biodiversity: A Global Perspective*, 327- 370.
- Tomlinson, P. B. (1986). The Botany of Mangroves, *Cambridge University Press*. 413 p.
- Valiela, I., Bowen, J. L., & York, J. K. (2001). Mangrove Forests: One of the World's Threatened Major Tropical Environments. *BioScience*, 51(10), 807. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0807:MFOOTW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0807:MFOOTW]2.0.CO;2)
- Varon-Lopez, M., Dias, A. C. F., Fasanella, C. C., Durrer, A., Melo, I. S., Kuramae, E. E., & Andreote, F. D. (2014). Sulphur-oxidizing and sulphate-reducing communities in Brazilian mangrove sediments. *Environmental Microbiology*, 16(3), 845–855. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12237>
- Vergara-Filho, W. L. A. (1993). Utilização da Endofauna e Incrustantes como Indicadores para Monitoramento de áreas de Manguezais. Manguezal do Rio São Braz, Mangaratiba, Rio de Janeiro. **Tese de Me**, p. 30.
- Wang, H., He, Z., Lu, Z., Zhou, J., Van Nostrand, J.D., Xu, X., Zhang, Z. (2012). Genetic linkage of soil carbon pools and microbial functions in subtropical freshwater wetlands in response to experimental warming. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (21), 7652–7661.
- Webber, M.K., Calumpong, H., Ferreira, B., Soares, M. (2016). Chapter 48: Mangroves. *United Nations World Assessment (UN)*, p.18.
- Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2009.
- Wong, R. G., Wu, J. R., & Gloor, G. B. (2016). Expanding the UniFrac toolbox. *PLoS ONE*, 11(9), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161196>
- Wu, P., Xiong, X., Xu, Z., Lu, C., Cheng, H., Lyu, X., ... Fang, H. (2016). Bacterial communities in the rhizospheres of three mangrove tree species from Beilun Estuary, China. *PLoS ONE*, 11(10), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164082>
- Xu, W., Shi, L., Chan, O., Li, J., Casper, P., & Zou, X. (2013). Assessing the effect of litter species on the dynamic of bacterial and fungal communities during leaf decomposition in microcosm by molecular techniques. *PLoS ONE*, 8(12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084613>
- Zhou, J., Xia, B., Treves, D. S., Wu, L., Marsh, T. L., Neill, R. V. O., ... Tiedje, J. M. (2002). Spatial and Resource Factors Influencing High Microbial Diversity in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, N(1), 326–334. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.326>
- Zhou, Z., Chen, J., Cao, H., Han, P., & Gu, J. D. (2014). Comparison of communities of both methane-producing and metabolizing archaea and bacteria in sediments between the northern South China Sea and coastal Mai Po Nature Reserve revealed by PCR amplification of *mcrA* and *pmoA* genes. *Frontiers in Microbiology*, 5(DEC), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00789>

ANEXOS

ANEXO 1 – Caracterização Físico-Química dos sedimentos da Floresta de Mangue da Ilha do Cardoso, Cananéia – SP

Análises realizadas pelo Laboratório de Solos, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP (Piracicaba - SP). Os sedimentos encaminhados para análise foram coletados na Ilha do Cardoso, ente as coordenadas 25°05’01,8”S-47°57’45,7”W em uma profundidade de 0 a 10 cm.

Tabela A1. Análises Físico-Químicas dos Sedimentos da Floresta de Mangue da Ilha do Cardoso.

DETERMINAÇÃO	UNIDADE	RESULTADO
Composição Física		
Aréia Total	g kg ⁻¹	160
Silte	g kg ⁻¹	481
Argila (c/ disp.)	g kg ⁻¹	359
Classe de textura	-	Argila
Condutividade Elétrica		
C.E.	uS.cm ⁻¹	19,88
Umidade		
Umid.total	%	22,29
Dados Químicos		
pH _{CaCl₂}	-	5,9
M.O. (Colorimétrica)	g.dm ⁻³	112
P (Resina)	mg.dm ⁻³	11
S (Fosfato de cálcio 0,01 mol.L ⁻¹)	mg.dm ⁻³	2572
K (Resina)	mmol.dm ⁻³	15,1
Ca (Resina)	mmol.dm ⁻³	75
Mg (Resina)	mmol.dm ⁻³	151
Al – Colorimetria (KCL 1 mol.L ⁻¹)	mmol.dm ⁻³	<1
H+Al (SMP)	mmol.dm ⁻³	15
SB	mmol.dm ⁻³	241,1
CTC	mmol.dm ⁻³	256,1
V	%	94
M	%	0
Metais Traço		
Boro (água quente)	mg.dm ⁻³	5,2
Cobre (DTPA)	mg.dm ⁻³	0,9
Ferro (DTPA)	mg.dm ⁻³	122
Manganês (DTPA)	mg.dm ⁻³	47,1
Zinco (DTPA)	mg.dm ⁻³	6,4
Si (CaCl ₂ 0,01 mol.L ⁻¹)	mg.kg ⁻¹	46
Na (Mehlich 1)	mg.dm ⁻³	13400

ANEXO 2 – Temperatura Média da Água do Mar, Cananéia – SP

Tabela A2. Temperatura média da água do mar de Cananéia (25°05'S – 47°05'W), no período de 1960 a 2016.

Mês	Temperatura Média (°C)
Janeiro	26,48
Fevereiro	27,38
Março	26,58
Abril	25,32
Maio	23,92
Junho	21,84
Julho	20,87
Agosto	20,71
Setembro	21,03
Outubro	21,83
Novembro	23,20
Dezembro	24,53

ANEXO 3 – Análises de Variância dos Resultados das Métricas de Alfa Diversidade

Figura A1. Comparação dos resultados das diferentes métricas de α diversidade entre as espécies vegetais estudadas. Letras sobre os diagramas indicam diferenças significativas ao nível α 0,05 pelo teste de Tukey para as métricas em que houve variância em função do tempo.

Tabela A3. Análises de variância dos resultados das diferentes métricas de alfa diversidade comparando os fatores “Tempo” e “Planta”.

	Df	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F	p
OTUs Observadas					
Tempo	1	29907573	29907573	59,4863	9,911e-13
Planta	2	178985	89492	0,1780	0,837098
Tempo: Planta	2	6511473	3255737	6,4757	0,001948
Resíduos	170	85469841	502764		
Chao1					
Tempo	1	1,2597e+22	1,2597e+22	0,1744	0,67674
Planta	2	4,8773e+22	2,4386e+22	0,3377	0,71392
Tempo: Planta	2	6,0627e+23	3,0314e+23	4,1973	0,01662
Resíduos	170	1,2278e+25	7,2222e+22		
Shannon					
Tempo	1	1,0846e+23	1,0846e+23	1,2325	0,26849
Planta	2	2,4771e+23	1,2385e+23	1,4075	0,24759
Tempo: Planta	2	6,5110e+23	3,2555e+23	3,6996	0,02675
Resíduos	170	1,4959e+25	8,7996e+22		
Diversidade Filogenética					
Tempo	1	5,5983e+15	5,5983e+15	39,3070	2,887e-09
Planta	2	2,7135e+14	1,3568e+14	0,9526	0,38778
Tempo: Planta	2	7,8830e+14	3,9415e+14	2,7674	0,06566
Resíduos	170	2,4212e+16	1,4243e+14		

Tabela A4. Análise de variância dos resultados de OTUs Observadas.

	Df	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	p
<i>Rhizophora mangle</i>					
Tempo	1	4286039	4286039	7,5534	0,008262
Temperatura	1	689624	689624	1,2153	0,275453
pH		282426	282426	0,4977	0,483712
Tempo: Temperatura	1	1165004	1165004	2,0531	0,157998
Tempo: pH	1	124500	124500	0,2194	0,641486
Temperatura: pH	1	180551	180551	0,3182	0,575171
Tempo:Temperatura:pH	1	52513	52513	0,0925	0,762205
Resíduos	51	28939150	567434		
<i>Laguncularia racemosa</i>					
Tempo	1	4545927	4545927	10,6625	0,001998
Temperatura	1	8660043	8660043	20,3122	4,097e-05
pH	1	328197	328197	0,7698	0,384565
Tempo: Temperatura	1	9013175	9013175	21,1404	3,025e-05
Tempo: pH	1	146972	146972	0,3447	0,559811
Temperatura: pH	1	6220	6220	0,0146	0,904352
Tempo:Temperatura:pH	1	347781	347781	0,8157	0,370853
Resíduos	49	20891045	426348		
<i>Avicennia Schaueriana</i>					
Tempo	1	27539698	27539698	107,8445	2,776e-14
Temperatura	1	252072	252072	0,9871	0,3251
pH	1	275404	275404	1,0785	0,3038
Tempo: Temperatura	1	219538	219538	0,8597	0,3581
Tempo: pH	1	85373	85373	0,3343	0,5656
Temperatura: pH	1	98010	98010	0,3838	0,5383
Tempo:Temperatura:pH	1	433273	433273	1,6967	0,1985
Resíduos	52	13278971	255365		

Tabela A5. Análise de variância dos resultados de Chao1.

	Df	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	p
<i>Rhizophora mangle</i>					
Tempo	1	4,8271e+22	4,8271e+22	0,5953	0,4439
Temperatura	1	1,5093e+22	1,5093e+22	0,1861	0,6680
pH		1,5448e+20	1,5448e+20	0,0019	0,9654
Tempo: Temperatura	1	1,8931e+22	1,8931e+22	0,2335	0,6345
Tempo:pH	1	1,0451e+22	1,0451e+22	0,1289	0,7211
Temperatura:pH	1	1,6432e+22	1,6432e+22	0,2027	0,6545
Tempo:Temperatura:pH	1	1,3756e+22	1,3756e+22	0,1697	0,6821
Resíduos	51	4,1351e+24	8,1081e+22		
<i>Laguncularia racemosa</i>					
Tempo	1	4,8856e+23	4,8856e+23	8,7072	0,004851
Temperatura	1	2,8729e+23	2,8729e+23	5,1200	0,028118
pH	1	1,8377e+21	1,8377e+21	0,0328	0,857134
Tempo:Temperatura	1	1,3197e+18	1,3197e+18	0,0000	0,996150
Tempo:pH	1	1,0474e+22	1,0474e+22	0,1867	0,667603
Temperatura:pH	1	2,8693e+21	2,8693e+21	0,0511	0,822038
Tempo:Temperatura:pH	1	4,4044e+21	4,4044e+21	0,0785	0,780527
Resíduos	49	2,7494e+24	5,6110e+22		
<i>Avicennia Schaueriana</i>					
Tempo	1	8,1524e+22	8,1524e+22	0,9432	0,33596
Temperatura	1	2,8548e+22	2,8548e+22	0,3303	0,56798
pH	1	6,6449e+21	6,6449e+21	0,0769	0,78268
Tempo:Temperatura	1	1,6497e+23	1,6497e+23	1,9086	0,17303
Tempo:pH	1	3,4399e+23	3,4399e+23	0,3980	0,53091
Temperatura:pH	1	2,6884e+23	2,6884e+23	3,1103	0,08367
Tempo:Temperatura:pH	1	1,3465e+22	1,3465e+22	0,1558	0,69469
Resíduos	52	4,4947e+24	8,6437e+22		

Tabela A6. Análise de variância dos resultados do índice de Shannon.

	Df	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	p
<i>Rhizophora mangle</i>					
Tempo	1	7,4253e+22	7,4253e+22	0,6601	0,4203
Temperatura	1	4,1828e+21	4,1828e+21	0,0372	0,8479
pH		1,0409e+23	1,0409e+23	0,9254	0,3406
Tempo: Temperatura	1	3,6884e+22	3,6884e+22	0,3279	0,5694
Tempo:pH	1	2,2357e+22	2,2357e+22	0,1988	0,6576
Temperatura:pH	1	7,3419e+22	7,3419e+22	0,6527	0,4229
Tempo:Temperatura:pH	1	9,6446e+22	9,6446e+22	0,8574	0,3588
Resíduos	51	5,7369e+24	1,1249e+23		
<i>Laguncularia racemosa</i>					
Tempo	1	6,8721e+23	6,8721e+23	7,1904	0,00996
Temperatura	1	2,1123e+21	2,1123e+21	0,0221	0,88243
pH	1	2,4969e+22	2,4969e+22	0,2612	0,61156
Tempo:Temperatura	1	3,4252e+22	3,4252e+22	0,3584	0,55217
Tempo:pH	1	1,2603e+23	1,2603e+23	1,3186	0,25642
Temperatura:pH	1	1,0056e+22	1,0056e+22	0,1052	0,74704
Tempo:Temperatura:pH	1	1,0292e+23	1,0292e+23	1,0769	0,30449
Resíduos	49	4,6831e+24	9,5574e+22		
<i>Avicennia Schaueriana</i>					
Tempo	1	5,0669e+20	5,0669e+20	0,0081	0,928853
Temperatura	1	4,1993e+22	4,1993e+22	0,6672	0,417767
pH	1	4,9389e+22	4,9389e+22	0,7847	0,379791
Tempo:Temperatura	1	4,9081e+23	4,9081e+23	7,7979	0,007302
Tempo:pH	1	2,1615e+22	2,1615e+22	0,3434	0,560404
Temperatura:pH	1	1,0152e+22	1,0152e+22	0,1613	0,689617
Tempo:Temperatura:pH	1	1,4500e+22	1,4500e+22	0,2304	0,633265
Resíduos	52	3,2730e+24	6,2942e+22		

Tabela A7. Análise de variância dos resultados de Diversidade Filogenética.

	Df	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	p
<i>Rhizophora mangle</i>					
Tempo	1	7,0911e+14	7,0911e+14	3,2373	0,0779
Temperatura	1	1,2351e+14	1,2351e+14	0,5639	0,4562
pH		7,2374e+12	7,2374e+12	0,0330	0,8565
Tempo: Temperatura	1	5,0703e+14	5,0703e+14	2,3147	0,1343
Tempo:pH	1	1,0395e+14	1,0395e+14	0,4746	0,4940
Temperatura:pH	1	8,3909e+12	8,3909e+12	0,0383	0,8456
Tempo:Temperatura:pH	1	2,9291e+14	2,9291e+14	1,3372	0,2529
Resíduos	51	1,1171e+16	2,1904e+14		
<i>Laguncularia racemosa</i>					
Tempo	1	1,3922e+15	1,3922e+15	15,2041	0,0002936
Temperatura	1	1,1493e+15	1,1493e+15	12,5513	0,0008806
pH	1	1,9378e+14	1,9378e+14	2,1163	0,1521113
Tempo:Temperatura	1	1,1907e+15	1,1907e+15	13,0037	0,0007271
Tempo:pH	1	1,3635e+12	1,3635e+12	0,0149	0,9033743
Temperatura:pH	1	1,9543e+13	1,9543e+13	0,2134	0,6461335
Tempo:Temperatura:pH	1	1,8325e+14	1,8325e+14	2,0013	0,1634924
Resíduos	49	4,4867e+15	9,1566e+13		
<i>Avicennia Schaueriana</i>					
Tempo	1	4,2731e+15	4,2731e+15	50,2741	3,55e-09
Temperatura	1	1,8651e+13	1,8651e+13	0,2194	0,64143
pH	1	1,8662e+12	1,8662e+12	0,0220	0,88278
Tempo:Temperatura	1	1,7867e+13	1,7867e+13	0,2102	0,64851
Tempo:pH	1	2,3031e+13	2,3031e+13	0,2710	0,60489
Temperatura:pH	1	1,5257e+12	1,5257e+12	0,0180	0,89393
Tempo:Temperatura:pH	1	2,9071e+14	2,9071e+14	3,4203	0,07009
Resíduos	52	4,4198e+15	8,4996e+13		