ANDRÉ LUÍS BRAGHINI SÁ

DIVERSIDADE DE RIZOBACTÉRIAS ENDOGLICOLÍTICAS ISOLADAS DE
MANGUE VERMELHO (*Rhizophora mangle*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo/ Instituto Butantan/ Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para obtenção de título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2008

ANDRÉ LUÍS BRAGHINI SÁ

DIVERSIDADE DE RIZOBACTÉRIAS ENDOGLICOLÍTICAS ISOLADAS DE
MANGUE VERMELHO (*Rhizophora mangle*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo/ Instituto Butantan/ Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para obtenção de título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Itamar Soares de Melo

São Paulo
2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Sá, André Luís Braghini.

Diversidade de rizobactérias endoglicolíticas isoladas de mangue vermelho (*Rhizophora mangle*) / André Luís Braghini Sá. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Itamar Soares de Melo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia EP/IPT/ICB/Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Ecologia microbiana.

Versão do título para o inglês: Diversity of endoglucolytic rhizobacteria isolated from red mangrove (*Rhizophora mangle*).

Descritores: 1. *Bacillus subtilis* 2. Biofilme 3. Endoglicanase 4. Salinidade 5. EglA 6. I. Melo, Itamar Soares de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB5/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): André Luís Braghini Sá.

Título da Dissertação: Diversidade de rizobactérias endoglucolíticas isoladas de mangue vermelho (*Rhizophora mangle*) .

Orientador(a): Itamar Soares de Melo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

A minha esposa Neide, que com seu amor incondicional esteve em todos os momentos me amparando e me dando força. Que com sua serenidade e sensatez, me colocou por muitas vezes no caminho certo e que como um anjo, carregou seu doce e amado fardo.

DEDICO

Aos meus pais e minha madrinha, que não puderam acompanhar de perto o desenrolar do trabalho, mas que sempre acreditaram e apostaram no meu sucesso...

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente ao meu orientador, professor Itamar, cuja paciência, amizade e sobretudo confiança, permitiu-me a liberdade para o desenrolar do trabalho;
- Ao meu incomparável “sócio de pesquisas” e grande amigo Armando, que está comigo desde a graduação e que dividiu cada momento de dificuldade e de alegria. Juntos crescemos e juntos muito temos ainda a nos completar como profissionais. O segredo do nosso sucesso reside na amizade que a tudo sobrepuja;
- Ao “antigos” professores, MSc. Francisco Eduardo de Carvalho Costa e Dr. Manoel Araújo Teixeira, por instigarem minha curiosidade e indicar-me o mundo da pesquisa;
- Ao companheiro Alexandre Sereda, “secretário do chefe”, que perdeu vários dias e muitas horas ao nosso lado, partilhando nossa batalha e dividindo o cafezinho. E que com seu grande coração, sempre esteve ao lado oferecendo importantes auxílios;
- À equipe da Embrapa Meio Ambiente, em especial à Rosely e ao João Luís, cuja disposição incomparável, ajudou muitas vezes, inclusive discutindo e analisando dados;
- Ao pessoal do Laboratório de Genética da Esalq, em cujo ambiente absolutamente agradável, encontrei pessoas do mais alto nível e de gigante coração;
- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Meio Ambiente, por ceder o Laboratório de Microbiologia Ambiental para a realização do trabalho;
- À Fábíia, Eliane e mais recentemente ao Marcos, pelas instruções e dicas sempre atenciosas;
- À FAPESP pelo financiamento do projeto, que permitiu o desenvolvimento do trabalho.

MUITO OBRIGADO A TODOS..... O SUCESSO É NOSSO!

***“O fracasso jamais te surpreenderá, se sua decisão de vencer for
suficientemente forte”***

(Autor desconhecido)

RESUMO

SÁ, A. L. B., **Diversidade de Rizobactérias Endoglicolíticas Isoladas de Mangue Vermelho (*Rhizophora mangle*)**. 2008. 60f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Os manguezais são ambientes amplamente ricos em biodiversidade, onde se destaca como funcionalidade do ecossistema a intensa ciclagem dos nutrientes. Sua localização estratégica, na transição entre os ambientes terrestre e marinho, permite uma biodiversidade funcional que o capacita sobreviver em áreas distintas, geralmente consideradas inadequadas por outras espécies vegetais. O principal representante vegetal deste ecossistema é a espécie arbórea *Rhizophora mangle*. Este estudo teve por objetivo conhecer a diversidade bacteriana além de determinar a atividade endoglicolítica e o perfil de tolerância à salinidade de rizobactérias associadas à espécie vegetal *Rhizophora mangle*. Para tanto, foram amostradas plantas desta espécie nos manguezais de Bertioga, que apresenta contaminação com petróleo, e Cananéia, que constitui um ambiente não impactado. Foram isoladas 129 bactérias, sendo uma maior diversidade observada nas amostras de Cananéia. Destas bactérias, 30 apresentaram atividade endoglicolítica, principalmente devido à produção da enzima (1,4-[1,3,1,4])- β -D-glucan 4-glucanohidrolase em isolados de *Bacillus subtilis*, que teve o isolado 39a caracterizado como melhor produtor. A presença de um dos genes necessários para a atividade de endocelulase foi confirmada por amplificação usando *primers* específicos para o gene *EglA*. As linhagens endoglicolíticas testadas para salinidade mostraram-se halotolerantes, com destaque para o mesmo isolado 39a (*Bacillus subtilis*), que se desenvolveu em concentrações de NaCl 20%. A microscopia eletrônica de varredura dos isolados bacterianos cultivados em diferentes concentrações de salinidade mostrou significativa produção de biofilme microbiano nas concentrações mais altas, o que sugere a atuação do biofilme como um mecanismo de tolerância ao ambiente salino. Os resultados obtidos indicam que a preservação do ecossistema cria um ambiente mais diverso de bactérias, e mostra que bactérias afiliadas taxonomicamente à *Bacillus* spp. são as principais produtoras de endoglicanases, além de serem capazes de responder ao stress salino, formando biofilme.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*. Biofilme. Endoglicanase. Salinidade. *EglA*.

ABSTRACT

SÁ, A. L. B., **Diversity of endoglucolytic rhizobacteria isolated from red mangrove (*Rhizophora mangle*)**. 2008. 60f. Master thesis (Biotechnology). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Mangroves are environments with a high biodiversity, highly dependent on the intense nutrient cycling for the ecosystem maintenance. The strategic localization of the mangroves, in the transition area from the terrestrial to marine environments, allows the development of a particular functional diversity, not explored by most of species. The main plant found in this ecosystem is the species *Rhizophora mangle*. The present study had as the objective to describe the bacterial diversity and to explore the endoglycolytic activity and the salt tolerance profile of rhizobacteria associated to *R. mangle*. In order to achieve it, plants were sampled from mangroves located in Bertioga, contaminated by oil, and in Cananéia, preserved mangrove. The number of 129 bacteria was isolated, where a higher diversity was observed in samples from Cananéia. From all isolates, 30 of them presented the endoglycolytic activity, mainly due to the production of the specific enzyme (1,4-[1,3,1,4])- β -D-glucan 4-glucanohidrolase, commonly found in isolates classified as *Bacillus subtilis*, which have the isolate 39a characterized as the major enzyme producer. The presence of one of the essential genes for the endocelulase activity was detected by amplification using specific primers for the *EglA* gene. The endoglycolytic isolates revealed to be also salt-tolerant, remarking the development of the isolate 39a, observed in concentrations of 20% NaCl. The scanning electron microscopy analyses to the development of isolates in different salt concentrations show the significant effects of salt on bacterial biofilm formation, acting as a protector agent against the saline environment. The results indicate that the preservation of mangrove constitute an environment able to maintain a higher bacterial diversity and also show that bacteria affiliated taxonomically to *Bacillus* spp. are the mains producers of endoglycanase and responsive to the saline stress, forming biofilms.

Key words: *Bacillus subtilis*. Biofilm. Endoglucanase. Salinity. *EglA*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição dos manguezais no Brasil.....	18
Figura 2. Visão geral do manguezal de Cananéia apresentando a franja coberta por <i>Rhizophora mangle</i>	19
Figura 3. Esquema simplificado do processo de hidrólise da celulose	24
Figura 4. Locais de coleta das amostras para o estudo. Os círculos indicam os municípios onde os manguezais amostrados estão localizados.	28
Figura 5. Densidade da comunidade bacteriana total isolada a partir de amostras de rizosfera de plantas de <i>R. mangle</i> localizadas em diferentes manguezais (Cananéia e Bertiooga) e em diferentes pontos de amostragem (A, B e C). Barras com letras diferentes significativas de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$).	34
Figura 6. Coeficientes de degradação dos isolados endoglicolíticos considerando a origem de isolamento (Cananéia e Bertiooga). As barras representam as medidas do halo menos a das colônias por isolado ($n=3$) e as diferentes letras mostram diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p<0,05$)	35
Figura 7. Análise semiquantitativa da produção de endoglicanase pelos isolados endoglicolíticos obtidos da rizosfera de <i>Rhizophora mangle</i> . As barras representam as médias das absorbâncias ($n=5$) em relação aos isolados e as letras diferentes indicam a diferença estatística significativa (Tukey, $p<0,0001$).....	38
Figura 8. Crescimento dos isolados avaliados nas diferentes concentrações de NaCl adicionadas ao meio de cultivo. A avaliação do desenvolvimento dos isolados endoglicolíticos foi feita após 7 dias.....	39
Figura 9. Imagem de MEV em aumento de 20.000x (Barra de 2 μ m), evidenciando endósporos do isolado endoglicolítico 10a crescido em meio sólido por 7 dias suplementado com 3% (0,51M) de NaCl	40

Figura 10. Imagem de MEV em aumento de 10.000x (Barra de 2µm), evidenciando endósporos do isolado endoglicolítico 57a crescido em meio sólido por 7 dias suplementado com 7% (1,2M) de NaCl	40
Figura 11. Imagem de MEV em aumento de 10.000x (Barra de 2µm) do isolado endoglicolítico 57a evidenciando células vegetativas alongadas e produção de biofilme quando crescido em meio sólido por 7 dias suplementado com 10% (1,7M) de NaCl.....	41
Figura 12. Imagem de MEV em aumento de 4.500x (Barra de 5µm) do isolado endoglicolítico 10a evidenciando células vegetativas alongadas e maior produção de biofilme quando crescido em meio sólido por 7 dias suplementado com 15% (2,5M) de NaCl.....	41
Figura 13. Imagem de MEV em aumento de 10.000x (Barra de 2µm) do isolado endoglicolítico 60a evidenciando células vegetativas envolvidas por densa camada de biofilme quando crescido em meio sólido por 7 dias suplementado com 20% (3,4M) de NaCl.....	42
Figura 14. Imagem de MEV em aumento de 5.000x (Barra de 5µm) do isolado endoglicolítico 60a evidenciando células vegetativas envolvidas por densa camada de biofilme quando crescido em meio sólido por 7 dias suplementado com 20% (3,4M) de NaCl.....	42
Figura 15. Tubos de ensaio mostrando diferenças de densidade celular, apontadas pela turbidez do meio de cultura em diferentes salinidades após 60h do inóculo inicial. (A): sem inóculo bacteriano - controle; (B): sem NaCl; (C): 3% NaCl; (D): 5% NaCl; (E): 7% NaCl; (F): 10% NaCl; (G): 15% NaCl e (H): 20% NaCl.....	43
Figura 16. Curvas de crescimento do isolado 39a de <i>Bacillus subtilis</i> em meio de cultura com diferentes concentrações salinas. O desvio padrão está representado pelos números que acompanham as curvas	44
Figura 17. Imagem de MEV em aumento de 10.000x (Barra de 2µm) de células vegetativas de <i>Bacillus subtilis</i> – 39a crescido em meio líquido sem NaCl por 60 horas.....	45

Figura 18. Imagem de MEV em aumento de 10.000x (Barra de 2µm) de células vegetativas de <i>Bacillus subtilis</i> – 39a evidenciando discreto alongamento celular quando crescido em meio líquido por 60 horas suplementado com 5% (0,8M) de NaCl.....	45
Figura 19. Imagem de MEV em aumento de 20.000x (Barra de 2µm) de células vegetativas de <i>Bacillus subtilis</i> – 39a evidenciando alongamento celular e produção de exopolissacarídeos (biofilme) quando crescido em meio líquido por 60 horas suplementado com 20% (3,4M) de NaCl.....	46
Figura 20. Imagem de MEV em aumento de 100x (Barra de 200µm) de cristal de NaCl, presente em grande quantidade em meio líquido suplementado com 20% (3,4M) de NaCl.....	46
Figura 21. Dosagem semi-quantitativa da atividade endoglicolítica de <i>Bacillus subtilis</i> (isolado 39a) em meios de cultura contendo farelo de trigo e CMC e sob diferentes concentrações de NaCl. As barras representam as médias das absorbâncias em relação às concentrações salinas e as letras diferentes indicam a diferença estatística significativa (Teste de Tukey, $p<0,01$).....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número e frequência de isolados endoglicolíticos associados a <i>Rhizophora mangle</i> nos diferentes manguezais amostrados.....	35
Tabela 2. Identificação dos isolados endoglicolíticos associados à rizosfera de <i>Rhizophora mangle</i>	36
Tabela 3. Distribuição taxonômica dos isolados endoglicolíticos da rizosfera de plantas de <i>R. mangle</i> localizadas nos diferentes manguezais amostrados.....	37
Tabela 4. Distribuição taxonômica dos isolados não endoglicolíticos presentes na rizosfera de plantas da espécie <i>R. mangle</i>	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Manguezal	15
2.2 <i>Rhizophora mangle</i>	17
2.3 Rizobactérias: importância e atividades funcionais.....	18
2.4 Ciclagem de nutrientes no manguezal	19
2.4.1 Compostos lignocelulósicos	20
2.4.2 Celulases bacterianas.....	21
2.5 Salinidade e osmoregulação	22
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Locais de obtenção das plantas.....	25
4.1.1 Cananéia	25
4.1.2 Bertioga	25
4.2 Coleta.....	25
4.3 Isolamento de bactérias rizosféricas	26
4.4 Identificação dos isolados pela análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (MIDI-FAME).....	27
4.5 Determinação da atividade endoglicolítica.....	28
4.6 Quantificação da atividade endoglicolítica.....	28
4.7 Quantificação da atividade endoglicolítica em diferentes substratos e salinidades	28
4.8 Caracterização fisiológica de requerimento salino para crescimento.....	29
4.9 Quantificação do crescimento em diferentes concentrações salinas	29
4.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para avaliação das alterações celulares induzidas pela salinidade	30
4.11 Extração de DNA genômico bacteriano	30
4.12 Amplificação do gene <i>EgIA</i>	30
4.13 Análise dos dados	31
5 RESULTADOS	32

5.1 Isolamento da comunidade de rizobactérias associadas a <i>Rhizophora mangle</i> e avaliação da produção de endoglicanases.....	32
5.2 Quantificação da atividade endoglicolítica.....	35
5.3 Quantificação da atividade endoglicolítica dos isolados positivos no teste qualitativo.....	36
5.4 Caracterização fisiológica do desenvolvimento dos isolados em ambiente salino	37
5.5 Caracterização funcional do isolado endoglicolítico rizosférico 39a - <i>Bacillus subtilis</i>	41
6 DISCUSSÃO	47
6.1 Diversidade microbiana rizosférica associada a <i>R. mangle</i>	47
6.2 Biodegradação de compostos celulósicos nos manguezais de Cananéia e Bertioga e produção de endocelulase pelos isolados endoglicolíticos.....	49
6.3 Inibição <i>in vitro</i> fitopatógenos por rizobactérias associadas <i>R. mangle</i>	51
6.4 Caracterização fisiológica de requerimento salino para crescimento.....	52
6.5 Caracterização funcional de <i>Bacillus subtilis</i> – 39a	54
6.5.1 Crescimento em diferentes concentrações salinas.....	54
6.5.2 Quantificação da atividade celulolítica em diferentes substratos e salinidades	55
7 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

Os manguezais são ambientes amplamente diversos, sendo esta diversidade regida principalmente pela intensa ciclagem dos nutrientes. Sua localização estratégica, na transição entre os ambientes terrestre e marinho, permite uma biodiversidade funcional que o capacita a sobreviver em áreas distintas, geralmente evitadas por outras espécies vegetais.

A importância ecológica e econômica faz dos manguezais ambientes atrativos para a descrição de espécies ainda não conhecidas e para a exploração de novos recursos biotecnológicos. Entretanto, este ecossistema é considerado de grande vulnerabilidade, pois tem sofrido com as ações antrópicas e industriais, levando a contaminação e posterior degradação de tais ambientes. Dentro da lista de ações nocivas, destacam-se os derramamentos de óleo, que ocorrem em áreas próximas aos manguezais, sendo o efeito destes eventos persistentes por décadas. Quando não é feita a correção de tais acidentes, a biota do manguezal sofre grande impacto, resultando em alterações no perfil de espécies, sejam elas vegetais, animais ou microbianas. Tal impacto pode levar vários anos para ser reparado, podendo até mesmo levar à morte do manguezal.

Considerando a recuperação de áreas impactadas, uma alternativa que tem se mostrado eficaz, reside na utilização de microrganismos na recuperação de manguezais. Por exemplo, rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, quando inoculadas, podem contribuir para o crescimento de espécies de grande importância na composição do ambiente manguezal. Dentre as atividades responsáveis por esta promoção do crescimento vegetal pode-se listar a solubilização de fosfato, a produção de fitormônios e a fixação do nitrogênio atmosférico. Além destes recursos, vários microrganismos têm sido utilizados na biorremediação de áreas contaminadas por petróleo, atuando na degradação de moléculas de hidrocarbonetos.

Este projeto propõe conhecer a microbiota rizosférica de mangue vermelho (*Rhizophora mangle*) do estado de São Paulo considerando áreas preservadas e contaminadas por ação industrial. Adicionalmente, pretende-se estudar a atividade celulolítica com foco na atividade endoglicolítica como mecanismo de ciclagem de nutrientes e ferramenta para bioprospecção de potencial biotecnológico. Para o entendimento da ecologia dos isolados de interesse, o desenvolvimento destes microrganismos em diferentes concentrações de salinidade também é avaliado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Manguezal

Os manguezais, que possuem como principal representante vegetal a espécie arbórea *Rhizophora mangle*, constituem um ecossistema de transição entre os ambientes terrestre, marinho e de água doce (HOLGUIN et al., 1999).

A palavra “mangue” é utilizada geralmente com duas conotações. Uma delas se refere ao grupo de árvores tropicais de famílias relacionadas com características fisiológicas e adaptações especiais, como por exemplo variações em salinidade e depleção de oxigênio, que permitem a persistência de tais espécies nestes ambientes. A outra utilização da palavra, se refere ao ecossistema como um todo, embora o mais correto para tal seja manguezal, como *mangrove* do inglês (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000).

O ecossistema de manguezais apresenta-se amplamente distribuído geograficamente, cobrindo cerca de 60 a 75% da linha costeira mundial (HOLGUIN et al., 1999). O Brasil, a Indonésia e a Austrália são os países mais abundantes em ecossistemas de manguezal, onde só na América Latina, encontram-se cerca de 400.000 hectares (HOLGUIN et al., 2001).

No Brasil, dos 7.408Km² de zona costeira, 6.786Km² contém florestas de mangues, cobrindo em torno de 25.000Km² (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000) cuja distribuição é uma das maiores do mundo em extensão. Podemos encontrá-las desde o Cabo Orange, no Amapá, até o sul de Santa Catarina, na foz do Rio Araranguá, município de Laguna (CURY, 2002) (Figura 1).

A sua vegetação é representada pelos gêneros *Rhizophora*, *Laguncularia* e *Avicennia*. No gênero *Rhizophora* encontramos as espécies mangue vermelho, cujo nome científico é *R. mangle* (Família Rhizophoraceae), o mangue branco, *Laguncularia racemosa* (Família Combretaceae) e o mangue negro, representado pelas espécies *Avicennia germinans* e *Avicennia shaueriana* (Família Verbenaceae) (GAMERO, 2001; CURY, 2002).

Estas espécies vegetais coexistem no sistema manguezal com uma grande diversidade de animais e microrganismos, que compõem este diverso ecossistema.

Figura 1. Distribuição dos manguezais no Brasil

A importância deste ecossistema reside na grande produtividade biológica, com alta biodiversidade de peixes, crustáceos, moluscos, aves, répteis e mamíferos. Do ponto de vista ecológico, sua importância consiste em manter a base alimentar da cadeia trófica, evitar a erosão do solo pelas marés, assim como reduzir o assoreamento dos portos e diminuir os impactos decorrentes da lixiviação de compostos químicos (EYSINK e POFFO, 2002).

Apesar de constituírem Área de Preservação Permanente, os manguezais têm sofrido as mais diversas ações antrópicas na sua exploração com finalidades econômicas, agrícolas, de pesca predatória e depósito de lixo (EYSINK e POFFO, 2002). Os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos são importantes elementos poluentes que têm sido encontrados em manguezais de todo o globo terrestre, se destacando por serem altamente persistentes no ambiente. A principal fonte de contaminação por estes compostos são as descargas ilegais de efluentes e os derramamentos de petróleo (TAM et al., 2002). Os derramamentos de petróleo, que em sua maioria ocorrem durante o transporte, têm sido frequentes e a contaminação dos manguezais, podendo os efeitos persistirem por até mais de 20 anos, como no caso do canal de Bertioga - SP, que foi contaminado em outubro de 1983 por derramamento de um dos oleodutos da Petrobrás (CURY, 2002).

2.2 *Rhizophora mangle*

Rhizophora mangle é uma espécie vegetal da família Rhizophoraceae, conhecida popularmente como mangue vermelho, em função da cor vermelha observada no caule e no córtex de suas raízes jovens. Tais plantas podem atingir até 20m de altura em alguns ambientes e é normalmente encontrada nas franjas dos bosques (Figura 2), em contato com o mar ao longo dos canais, na desembocadura de alguns rios ou nas partes dos estuários onde a salinidade não é muito elevada (GAMERO, 2001). Tal distribuição se relaciona à capacidade de tolerância à salinidade, já que se trata de uma espécie halófito facultativa (DAWES, 1997).

Figura 2. Visão geral do manguezal de Cananéia apresentando a franja coberta por *Rhizophora mangle* (ALMEIDA, 2005).

A arquitetura das árvores de mangue permite sua estabilidade no substrato macio, característico do ecossistema. Para *Rhizophora*, além das raízes subterrâneas nutritivas, encontramos raízes adventícias, as conhecidas raízes escora, que se encurvam e servem de suporte, mecanismo essencial à sobrevivência nas franjas dos bosques, frequentemente alagadas (DAWES, 1997). Essas raízes, que se estendem a um metro ou mais acima do solo,

são cobertas por poros pequenos, as lenticelas, que permitem a difusão do oxigênio e ainda impedem a entrada de sais, favorecendo a troca de gases com a atmosfera (GAMERO, 2001).

Em relação ao mecanismo de reprodução, observa-se flores perfeitas que são polinizadas pelo vento e apresenta a produção de frutos verdes e vivíparos (propágulos), que permanecem na “árvore-mãe” durante a germinação dando origem a uma nova planta, voltada para baixo e que se desprende para se “auto-plantar” (DAWES, 1997; GAMERO, 2001). Os propágulos cumprem uma fase obrigatória de dispersão de várias semanas, antes de se fixarem a um substrato e iniciarem a produção de raízes. No caso destes propágulos não obterem contato com o sedimento, estes podem permanecer viáveis por vários meses, favorecendo o mecanismo de dispersão da espécie (KATHIRESAN e BINGHAM, 2001).

2.3 Rizobactérias: importância e atividades funcionais

A rizosfera é um termo que foi introduzido por Hiltner em 1904 e que define a camada do solo que é influenciada pelo metabolismo das raízes, o que constitui um nicho amplamente rico em microrganismos devido a exudação de metabólitos radiculares (BERG et al., 2005). Os principais compostos liberados pelas raízes neste ambiente são glicose, aminoácidos, ácidos orgânicos e vitaminas, que servem de substrato para os microrganismos (CHEN et al., 2006) e que consistem de aproximadamente 5 a 21% de todo carbono fixado via fotossíntese. Tais exudatos conferem um profundo efeito qualitativo e quantitativo sobre os microrganismos da rizosfera e essa influência é modulada pela habilidade do vegetal em modificar as condições do ambiente à partir da importação de íons, da rizodeposição e da alteração do pH do microambiente (EL SHATNAWI e MAKHADMEH, 2001).

O solo rizosférico constitui o principal reservatório de agentes microbianos que atuam na ciclagem de nutrientes, produção de toxinas, biosurfactantes e enzimas extracelulares como pectinases, amilases, quitinases e endoglicanases (BERG et al., 2005) e que promovem o crescimento das plantas através da fixação do nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de fitormônios, síntese de sideróforos e biocontrole de fitopatógenos (HOLGUIN et al., 2001; MELO e AZEVEDO, 2000). Berg et al. (2005) relatam ainda a importância da rizosfera como reservatório de bactérias potencialmente patogênicas à espécie humana, isoladas de várias culturas como *Burkholderia cepacia*, presente em batata, morango, milho e trigo. Assim sendo, o solo rizosférico é o preferido para o isolamento de bactérias colonizadoras de raízes (MELO e AZEVEDO, 2000), conhecidas como *rizobactérias*, por colonizarem agressivamente o sistema radicular (MELO e AZEVEDO, 1998).

No ecossistema de manguezais segundo Holguin et al. (2001), são encontradas rizobactérias fixadoras de nitrogênio (*Vibrio campbelli*, *Vibrio aestuarianus*, *Listonella anguillarum* e *Phyllobacterium* sp.), solubilizadoras de fosfato (*Bacillus amyloliquefasciens*, *Bacillus athrophaeus*, *Paenibacillus macerans*, *Xanthobacter agilis*, *Vibrio proteolyticus*, dentre outras) e redutoras de sulfato (*Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfosarcina* e *Desulfococcus*).

2.4 Ciclagem de Nutrientes no manguezal

A atividade microbiana consiste na principal via de ciclagem de nutrientes do manguezal, e isso ocorre através dos processos de decomposição da matéria orgânica. Pode-se dizer que as comunidades microbianas formam a base da cadeia alimentar da flora e fauna do ecossistema, criando uma relação de interdependência entre macro e microbiota. É possível formular a hipótese de que a ausência ou redução da microbiota promoverá prejuízo nas atividades comerciais e ecológicas; e possivelmente a destruição dos ecossistemas de manguezais (HOLGUIN et al., 2001).

Diversos são os microrganismos encontrados na rizosfera, nos sedimentos superficiais e nas folhas em decomposição. A comunidade microbiana do mangue é constituída por bactérias e fungos (91% da biomassa microbiana), algas (7%) e protozoários (2%) (HOLGUIN et al., 2001).

Nos ecossistemas aquáticos, a atividade bacteriana e das raízes tem importante influência na composição do sedimento em termos da disponibilidade de formas oxidadas e reduzidas de nutrientes orgânicos e inorgânicos. As bactérias participam dos processos de produção, transformação e decomposição da matéria orgânica, especialmente através dos processos de degradação (CUNHA, et al., 2005).

A atividade bacteriana heterotrófica é alta nos ambientes estuarinos, e tal fato foi observado com propriedade por Cunha e colaboradores (2005) à partir estudos com rizobactérias isoladas de *Halimione portulacoides*. As bactérias heterotróficas incluem microrganismos que apresentam alta atividade enzimática deegratativa de compostos orgânicos, como as atividades pectinolítica, celulolítica, amilolítica e proteolítica. Os fungos que decompõem a matéria orgânica do mangue possuem enzimas como pectinase, protease e amilase (HOLGUIN et al., 2001).

Apesar de serem muito ricos em matéria orgânica, os ecossistemas de manguezal sofrem por deficiência de alguns nutrientes, especialmente de nitrogênio e fósforo, que se

apresentam complexados a outras moléculas, tornando-se indisponíveis. Em contrapartida, uma alta taxa de suprimento desses nutrientes está relacionada à atividade bacteriana, que em mangues tropicais e subtropicais transformam a vegetação morta em fontes de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes que podem ser usados pelas plantas (BASHAN e HOLGUIN, 2002).

Nesse contexto, as bactérias estão envolvidas em processos de transformação (amonificação, nitrificação e denitrificação), e também se responsabilizam pela maior parte do fluxo de carbono em sedimentos de mangues tropicais através da capacidade de degradar compostos lignocelulósicos, que são os componentes principais das folhas e cascas de árvores presentes no ecossistema (HOLGUIN et al., 2001).

2.4.1 Compostos lignocelulósicos

Os compostos lignocelulósicos são os blocos construtores de todas as plantas e sua estrutura química confere a este substrato uma enorme importância biotecnológica, apesar de serem altamente recalcitrantes em função de sua difícil biodegradação, que depende da capacidade degradativa da população microbiana (MALHERBE e CLOETE, 2002). São encontrados como principal componente da parede celular de tecidos de plantas e constituem 90% do peso seco da célula vegetal. A lignocelulose é ubíqua e consiste na principal forma de carbono fixado na biosfera terrestre (AHMED et al., 2001).

Os componentes da lignocelulose são representados por três diferentes polímeros: lignina, hemicelulose e celulose. A lignina é o polímero aromático mais abundante do globo, encontrado nos tecidos lignificados (como por exemplo, na parede celular de vegetais lenhosos) (AHMED et al., 2001), e que está covalentemente ligado aos polissacarídeos celulósicos da biomassa lignocelulósica. A lignina é também o mais recalcitrante a biodegradação microbiana (POMETO III e CRAWFORD, 1986). Esse polímero de fenilpropano, que representa de 20 a 30% do total de lignocelulósicos, é degradado apenas por alguns fungos (como basidiomicetos de decomposição branca e decomposição parda, e ascomicetos e mitosporicos de decomposição branda) (FERRAZ, 2004) e actinobactérias (POMETO III e CRAWFORD, 1986) que produzem fenol-oxidases (enzimas extracelulares ligninolíticas representadas pela Manganês-peroxidase, Lignina-peroxidase e Lacase) e promovem sua completa mineralização até CO₂ e H₂O (CLEMENTE, 2002).

As hemiceluloses ou polioses são compostas por uma mistura de anidro-açúcares da glicose, manose e galactose (hexoses) e xilose e arabinose (pentoses), que se apresentam

como homopolímeros ou heteropolímeros ramificados, compondo em média 20% dos lignocelulósicos (FERRAZ, 2004). Constroem uma matriz na qual as fibras de celulose estão inseridas, constituindo a estrutura da parede celular de células vegetais. A degradação das hemiceluloses é um processo bastante complicado, mas sua clivagem é possível através de um complexo de enzimas hidrolíticas, como as xilanases (AHMED et al., 2001).

A celulose é o componente mais abundante dos lignocelulósicos (cerca de 50%) e consiste em um polímero linear (parte amorfo e parte cristalino) não ramificado de anidro-glicoses unidas por ligações β -(1-4)-glicosídicas (FERRAZ, 2004). Na estrutura cristalina da celulose, vemos moléculas altamente compactadas, enquanto que na estrutura amorfa, as moléculas estão fracamente compactadas, o que pode dificultar a hidrólise da celulose (WARREN, 1996).

2.4.2 Celulases bacterianas

As celulases constituem o segundo grande grupo de carboidrases exploradas comercialmente, e graças à eficiência e especificidade de ação destas enzimas, as celulases têm sido utilizadas cada vez mais na indústria química e na agricultura (ÂNGELO, 2004).

Quando se analisa o mundo microbiano, percebe-se que a maior parte dos organismos celulolíticos está contida no Domínio *Bacteria* com maior concentração nas ordens *Actinomycetales*, *Clostridiales* e *Firmicutes* (LYND et al., 2002).

As estratégias celulolíticas adotadas pelas bactérias apresentam essenciais diferenças quando se considera microrganismos aeróbios e anaeróbios. Os anaeróbios lançam mão de um complexo protéico associado à membrana celular, o celulosoma, enquanto que os aeróbios produzem celulases extracelulares (LYND et al., 2002).

As endocelulases ou endoglucanases, são representadas por 1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolase (E.C. 3.2.1.4) e clivam aleatoriamente regiões amorfas da cadeia de celulose, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos. As exocelulases ou exoglucanases incluem 1,4- β -D-glucan-glucanohidrolase, também conhecidas como celodextrinases (E.C. 3.2.1.74) e 1,4- β -D-glucan-celobiohidrolases, as conhecidas celobiohidrolases (E. C. 3.2.1.91), que atuam nos terminais das cadeias dos oligossacarídeos gerados pelas endocelulases, liberando glicose ou celobiose. As exocelulases atuam ainda “desmontando” a celulose microcristalina. Por fim as glicosidades, corretamente β -glicosidases ou β -glicosídeo

glicohidrolase (E.C. 3.2.1.21) hidrolisam celodextrina e celobiose a glicose (LYND et al., 2002) (Figura 3).

Figura 3. Esquema simplificado do processo de hidrólise da celulose (MALHERBE e CLOETE, 2002).

2.5 Salinidade e Osmoregulação

A vida nos ambientes aquáticos salinos é por uma ampla variedade de microrganismos. Esses microrganismos apresentam adaptações importantes que permitem sua permanência e reprodução nesses locais. Dentre os seres vivos, sobressaem-se as bactérias como principais habitantes dos ambientes salinos e hipersalinos (ZAHARAN, 1997). Porém percebe-se que a diversidade bacteriana é inversamente proporcional ao aumento das concentrações salinas (OREN, 2002).

A comunidade procariótica de ambientes salinos inclui em linhas gerais, grupos extremófilos (halofílicas) representados por componentes do Domínio Archaea e as bactérias facultativas (halotolerantes) classificadas no Domínio Bacteria, sendo estas últimas as mais abundantes (ZAHARAN, 1997). Considerando os representantes do Domínio Bacteria, vê-se que o ambiente salino é habitado por bactérias Gram-negativas (gêneros como *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Vibrio* e *Acinetobacter*) e Gram-positivas (com predomínio de *Bacillus* e *Micrococcus* além de uma pequena parcela de actinobactérias). Chamam à atenção também as

bactérias anaeróbias, que têm despertado interesse e têm sido isoladas em maiores frequências nestes ambientes salinos (ZAHARAN, 1997).

Muitas classificações têm sido propostas na determinação do perfil do desenvolvimento bacteriano frente à salinidade, no entanto, a mais utilizada é a de Kushner, que determina o requerimento salino para o ótimo crescimento, classificando as bactérias em: não halofílicas (crescem com salinidade em até 0,2M NaCl), levemente halofílicas (crescem em até 1,2M NaCl), moderadamente halofílicas (crescem em até 2,5M NaCl) e extremamente halofílicas (crescendo em 2,5M NaCl ou mais). Já as bactérias que crescem na ausência de NaCl e que também podem crescer na presença de concentrações relativamente altas como até 1,2M e até 2,5M são chamadas respectivamente de halotolerantes e e halotolerantes extremas (VENTOSA et al., 1998).

Para sobreviver no ambiente salino, as bactérias podem desenvolver um dos mecanismos de osmoadação: a concentração de sais (NaCl ou K^+) pode ser ajustada internamente em concentração compatível à do ambiente, ou o NaCl pode ser excretado e então iniciada a produção ou captação de solutos compatíveis (p. ex.: betaína).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O principal objetivo do presente trabalho é o isolamento, identificação e caracterização de bactérias com atividade endoglicolítica associadas a *Rhizophora mangle*, em um ambiente antropicamente impactado e outro preservado. Adicionalmente o papel da salinidade do comportamento destas bactérias frente a planta é avaliado.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho podem ser listados como:

- Determinar de maneira qualitativa a atividade endoglicolítica dos isolados bacterianos obtidos de amostras da rizosfera de *R. mangle*;
- Semi-quantificar a atividade da enzima 1,4- β -D-glican-4-glicanohidrolase nestes isolados;
- Caracterizar a tolerância dos isolados de interesse a diferentes concentrações de salinidade;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Locais de obtenção das plantas

As raízes de *Rhizophora mangle* foram coletadas em dois manguezais localizados no estado de São Paulo (Figura 4). O primeiro deles está localizado num ambiente conservado, o Parque Estadual da Ilha do Cardoso, que fica no município de Cananéia, enquanto que o segundo manguezal amostrado apresenta contaminação por petróleo e se localiza no município de Bertioga.

4.1.1 Cananéia

A área amostrada consiste em uma transversal com 340m de extensão ao longo do gradiente de inundação no manguezal, de orientação 180°S com início na bacia de Trampandé estendendo-se até o ambiente terrestre. As coordenadas geográficas para a área (franja) são: Latitude (S) 22°42'01,00'' e Longitude (W) 46°58'57,7''. As características físico-químicas determinadas para a área (Sonda Horiba, modelo U-10) foram: pH, 7.7; oxigenação, 4.4 e temperatura: 28° C.

4.1.2 Bertioga

Para Bertioga, a área foi georreferenciada (franja do bosque) em Latitude (S) 23°53'79,5'' e Longitude (W) 46°12'45,6'' e compreende ambiente que foi impactado em outubro de 1983 por derramamento de petróleo em uma área de 3500m³, à partir de um oleoduto da Petrobrás na altura do quilômetro 93 da rodovia Rio-Santos. As características físico-químicas determinadas para a área (Sonda Horiba, modelo U-10) foram: pH, 5.9; oxigenação, 0.6 e temperatura: 21° C.

Figura 4. Locais de coleta das amostras para o estudo. Os círculos indicam os municípios onde os manguezais amostrados estão localizados.

4.2 Coleta

De cada ambiente foram coletadas plantas em três pontos diferentes (ponto A: franja, ponto B: zona intermediária e ponto C: bosque de bacia). Em cada ponto amostrado cinco raízes subterrâneas nutritivas foram retiradas a partir de cinco árvores adultas, considerando a profundidade de amostragem da rizosfera de 10 a 15cm no sedimento.

As amostras foram acondicionadas em recipiente à temperatura de 4° C e levadas ao Laboratório de Microbiologia da EMBRAPA Meio Ambiente, para processamento.

4.3 Isolamento de bactérias rizosféricas

Para o isolamento de bactérias da rizosfera, amostras de solos aderidas às raízes (mix de 5 raízes/ponto de 5 árvores adultas) foram coletadas para compor 1g de solo de rizosfera. O isolamento bacteriano a partir das amostras de rizosfera foi feito pela técnica de diluição seriada onde 1g do solo rizosférico obtido de cada manguezal foi colocado em 9mL de solução salina esterilizada (1:10) e homogeneizado em agitador de tubos na potência média,

por 2 minutos. A primeira diluição (10^{-1}) foi mantida em agitação em shaker por uma hora e então procedeu-se a diluição até 10^{-7} .

De cada uma das diluições entre 10^{-5} a 10^{-7} , foram retirados 100µL que foram semeados em triplicata nos meios King's B e Agar Nutriente. Os meios de cultivo foram previamente suplementados com o antifúngico ciclohexamida (50µg/mL) além de terem a salinidade ajustada às condições do local de isolamento (1,8% NaCl). Após a incubação das placas a 28°C, procedeu-se o monitoramento do desenvolvimento e a contagem de colônias bacterianas durante o período de 30 dias.

4.4 Identificação dos isolados pela análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (MIDI-FAME)

Os isolados obtidos do isolamento foram submetidos a identificação filogenética por meio da análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular. Para tanto, os isolados foram inoculados em meio TSBA[®]BBL pelo método das estrias cruzadas e incubados a 28(±1)° C, por 24(±2)h. Decorrido este tempo, foram coletados 40mg (de 4 a 6 alças com capacidade de 10µL) do terceiro quadrante da placa e transferidos para tubos Kimax (100 x 13 mm). Adicionou-se então 1mL do reagente de saponificação e agitou-se durante 10 segundos. Os tubos foram colocados em banho-maria a 100° C por 5 minutos. Em seguida os tubos foram resfriados em água e novamente agitados por 10 segundos, retornando ao banho-maria por mais 25 minutos. Após resfriamento em água, adicionou-se 2mL do reagente de metilação. Os tubos foram agitados por 10 segundos e colocados em banho 80(±1)° C por 10 minutos, seguido por resfriamento em água. Foi adicionado 1,25mL do reagente de extração e a homogeneização procedeu-se em rotator clínico (FISHER M346) por 10 minutos. A fase inferior (aquosa) foi descartada e adicionou-se 3mL do reagente de lavagem básica, retornando os tubos para o rotator clínico por mais 5 minutos. Ao fim deste tempo, após centrifugação a 2000 x g/3 minutos, 2/3 da fase superior (0,5 mL) foram transferidos para os vials (2mL).

Para a análise dos ácidos graxos metilados, foi utilizado o cromatógrafo gasoso com injetor automático e detector *Flame Ionization Detector* (FID), marca Agilent, modelos 6850 e 7683, respectivamente. Obteve-se a interface pelos programas *ChemStation* A0901[1206] e *Sherlock* 4.0. O método e a biblioteca selecionados foram TSBA60.

O resultado foi expresso por meio de um cromatograma e um relatório elaborado pelos softwares, que contêm comprimento e área de picos, área nomeada, e tempo de retenção. O

resultado final foi apresentado de acordo com a similaridade entre o banco de dados e as áreas nomeadas, identificando dessa forma, o microrganismo em questão.

4.5 Determinação da atividade endoglicolítica

A atividade endoglicolítica foi determinada por degradação de substrato específico adicionado ao meio de cultivo. Para isso, a partir de cada isolado avaliado, foi coletada uma amostra de colônia com agulha e inoculada pontualmente em placa de petri contendo meio CMC - CarboxiMetilCelulose 1%. As placas foram então incubadas a 28° C por 4 dias. Decorrido este tempo, o meio foi coberto com solução de vermelho congo por 15 minutos. Em seguida, o excesso do corante foi retirado e o meio recoberto com solução de NaCl 1M por mais 15 minutos. A atividade endoglicolítica foi evidenciada pelo aparecimento de uma zona clara ao redor das colônias, em contraste com a cor vermelha do corante (Teather & Wood, 1982). O teste foi realizado em triplicata e utilizou-se a linhagem de *Bacillus subtilis* CCT0516 como controle positivo.

4.6 Quantificação da atividade endoglicolítica

A atividade de endoglicanase (1,4 [1,3,1,4] β -D-glicano, 4-glicanohidrolase) foi quantificada segundo Wirth e Wolf (1992) a partir da medida da taxa de clivagem de carboximetil substituído por celulose marcada com Remazol Brilliant Blue R (CM-cellulose-RBB nº 04100; Loewe Biochemica GmbH, Munich, Germany).

Os isolados avaliados foram incubados em erlenmeyers de 250mL por 4 dias a 28° C em meio farelo de trigo e meio CMC e mantidos em agitação contínua em shaker a 200rpm. A partir desta cultura, um volume de 200 μ L de CM-Cellulose-RBB foi adicionado a 200 μ L de acetato de sódio 0,2M (pH 4,5) e pré-aquecido a 40° C. Em seguida foram adicionados 400 μ L do caldo enzimático e incubados em banho-maria a 40° C por 60 minutos. A reação foi finalizada pela adição de 200 μ L de HCl 2M seguida de incubação em gelo por 10 minutos. O substrato não degradado foi precipitado por centrifugação a 15.000 x g por 5 minutos. A densidade óptica do produto da degradação foi determinada em espectrofotômetro Shimadzu a 600nm (OD₆₀₀). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como OD₆₀₀ min⁻¹ x 1000.

4.7 Quantificação da atividade endoglicolítica em diferentes substratos e salinidades

Para a quantificação da atividade endoglicolítica em diferentes substratos e em diferentes salinidades, utilizou-se meio CMC líquido e meio de farelo de trigo, suplementados com diferentes concentrações de NaCl: 3% (0,51M), 5% (0,8M), 7% (1,2M), 10% (1,7M), 15% (2,5M) e 20% (3,4M). Após o inóculo inicial, as culturas foram incubadas por 4 dias a 28° C e a quantificação procedeu-se segundo Wirth & Wolf (1992). Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.8 Caracterização fisiológica de requerimento salino para crescimento

Para a caracterização fisiológica quanto ao requerimento de cloreto de sódio para o desenvolvimento bacteriano, os isolados foram crescidos em meio Nutrient Agar suplementado com diferentes concentrações de NaCl: 3% (0,51M), 5% (0,8M), 7% (1,2M), 10% (1,7M), 15% (2,5M) e 20% (3,4M), conforme Hacene *et al.* (2002). A avaliação do crescimento foi realizada diariamente até o sétimo dia de incubação.

4.9 Quantificação do crescimento em diferentes concentrações salinas

A quantificação do crescimento em diferentes concentrações salinas foi feita em meio de cultivo Caldo Nutriente líquido suplementado com NaCl em diversas porcentagens (3%, 5%, 7%, 10%, 15% e 20%). O desenvolvimento dos isolados foi determinado em espectrofotômetro Shimadzu a 550nm (OD₅₅₀) nos intervalos de 0, 2, 4, 10, 15, 24, 48 e 60 horas após o inóculo inicial. O teste foi realizado em triplicata com alíquotas de 1000µL a cada leitura.

4.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para avaliação das alterações celulares induzidas pela salinidade

Os isolados selecionados para este tipo de análise foram crescidos por 7 dias para a análise em meio sólido e por 3 dias para a análise em meio líquido. As amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% e em tampão cacodilato 0,2M, pH 7.2 por duas horas a 28° C sob vácuo de 760mmHg. As amostras foram lavadas no mesmo tampão e desidratadas em série etanólica (etanol em água) crescente. A desidratação final foi realizada em acetona P.A. As

amostras foram então secas ao ponto crítico, montadas em "stubs" com fita de carbono e então metalizadas com uma fina camada de ouro. As observações foram feitas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) de alta resolução modelo Leo 982 GEMINIDMS – Zeiss e Leica da Embrapa Meio Ambiente.

4.11 Extração de DNA genômico bacteriano

As bactérias foram cultivadas em Caldo Nutriente sob agitação constante, por 24 horas. Posteriormente, foram centrifugados 1,5 mL das culturas bacterianas a 12.000 x g por 10 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em 500µL de TE e centrifugado por 2 minutos a 12.000rpm. O precipitado foi novamente ressuspensionado em 500µL de TE e foram adicionados 30µL de SDS 10%, 0,1g de esferas de sílica e agitados no aparelho bead beater por 30 segundos para o rompimento das células. A esta solução, foram adicionados 500µL de fenol, e a solução foi homogeneizada por inversão e então centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para eppendorfs novos e a estes foram acrescentados 200µL de fenol e 200µL de clorofórmio. Os eppendorfs foram agitados e centrifugados a 12.000 x g por 5 minutos. A fase aquosa foi coletada e 1/10 do volume de NaCl (5M) e 0,6% do volume de isopropanol (álcool isopropílico) foram adicionados, incubando-se no gelo por 5 minutos. Estas soluções foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos e os precipitados foram lavados com etanol 70% e secos à 37° C por 15 minutos. Os DNAs foram ressuspensionados em 50µL de água ultrapura e suas integridades foram verificadas colocando-se 5µL em gel de agarose 0,8% a 3 volts/cm. O gel foi corado em solução de brometo de etídio.

4.12 Amplificação do gene *EglA*

A amplificação do gene *EglA* foi realizada segundo Lima *et al.* (2005), com *primer* específico (*sense primer*: 5'-AAGGATGTTGGGCATGAG-3' e *antisense primer*: 5'-TTCACCAAACAGCTGCAC-3') desenhado para *Bacillus*, baseado na sequência nucleotídica conservada de endoglucanase, e amplificando fragmento de 1.209pb. Utilizou-se como controle positivo *Bacillus pumilus* CL15, do Laboratório de Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

A reação de PCR foi realizada em um volume de 50µL, contendo 0,2mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 0,1µM de cada primer, 2,5µM de Taq DNA polimerase, tampão 1X e

1µL de DNA molde (0,5 a 10 ng). A PCR foi realizada em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95° C, seguido de um ciclo de um minuto e meio a 94° C; um ciclo de 66° C por um minuto; um ciclo de um minuto e meio a 72° C; 35 ciclos de 94° C por um minuto e meio e uma extensão final de 10 minutos a 72° C. O fragmento de DNA amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (corado em solução de brometo de etídio - 1,0 mg/mL) a 3 volts/cm, juntamente com o marcador de peso molecular DNA *Ladder*, para a observação de um fragmento de aproximadamente 1200pb.

4.13 Análise dos dados

A análise estatística foi feita com o auxílio do programa SAS - Copyright^(c) 1989-1996 por SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. O delineamento do experimento foi fatorial em blocos casualizados e para a análise dos dados da dosagem semiquantitativa de endocelulase, utilizou-se as médias das absorbâncias dos tratamentos realizados.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento da comunidade de rizobactérias associadas a *Rhizophora mangle* e avaliação da produção de endoglicanases

O isolamento de bactérias da rizosfera de *Rhizophora mangle* mostrou diferenças na densidade da comunidade bacteriana associada às plantas localizadas nos diferentes manguezais avaliados, onde um maior número de UFC/g rizosfera (Unidades Formadoras de Colônia) foi observado em amostras do manguezal localizado em Cananéia. Neste manguezal a densidade bacteriana nos pontos amostrados mostram valores similares. Já nas amostras de Bertioga, que teve densidade bacteriana menor, o ponto B mostrou uma tendência a maior densidade de UFC/g rizosfera. Apesar dessa tendência, diferenças significativas entre as comunidades bacterianas presentes nos pontos A, B e C não puderam ser verificadas (Figura 5).

Figura 5. Densidade da comunidade bacteriana total isolada a partir de amostras de rizosfera de plantas de *R. mangle* localizadas em diferentes manguezais (Cananéia e Bertioga) e em diferentes pontos de amostragem (A, B e C). Barras com letras diferentes significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os isolados positivos para A partir dos isolados obtidos, um total de 129 isolados, foram selecionados para caracterização. Destes isolados, 93 foram obtidos do manguezal de Cananéia e 36 de Bertioga. Em relação aos meios de isolamento, os isolados foram obtidos em número de 59 em meio KB e 70 em meio NA.

Para avaliação da produção de endoglicanases, os isolados selecionados foram inoculados em meio de cultura contendo o substrato CMC. Dos 129 isolados avaliados, 30 apresentaram halo de degradação em placa característico de atividade de endocelulase (Figura 6). Dentre os isolados positivos para o testes, 22 foram obtidos de amostras de Cananéia e 8 de Bertioga. Apesar desta discrepância em números absolutos, considerando a frequência de isolados ativos para a enzima avaliada, os valores são similares, em 24% para Cananéia e 22% para Bertioga (Tabela 1).

Tabela 1. Número e frequência de isolados endoglicolíticos associados a *Rhizophora mangle* nos diferentes manguezais amostrados.

Origem	Isolados	Endoglicolíticos	Frequência (%)
Cananéia	93	22	24
Bertioga	36	8	22
Total	129	30	46

Figura 6. Coeficientes de degradação dos isolados endoglicolíticos considerando a origem de isolamento (Cananéia e Bertioga). As barras representam as medidas do halo menos a das colônias por isolado (n=3) e as diferentes letras mostram diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.2 Identificação dos isolados

A identificação dos isolados positivos para endoglicanase foi feita por meio da análise de ácidos graxos das membranas celulares. A aplicação desta metodologia mostrou ser eficiente na indentificação dos isolados, sendo que apenas duas bactérias não puderam ser identificadas por esta técnica (Tabela 2). O resultado das identificações mostrou que a atividade de endocelulase ocorre preferencialmente em isolados classificados como bactérias Gram positivas, sendo dos 30 isolados positivos 26 classificados neste grupo, mais precisamente dentro da classe Bacilli. Outro grupo representado entre os isolados positivos é o grupo das Actinobacteria, que apresentou dois isolados com a atividade enzimática avaliada (Tabela 3).

Tabela 2. Identificação dos isolados endoglicolíticos associados a rizosfera de *Rhizophora mangle*.

Isolado	Identificação	Origem	Ponto
1a	<i>Paenibacillus</i> sp.	Cananéia	B
3a	<i>Paenibacillus macerans</i>	Cananéia	B
9a	<i>Paenibacillus/Bacillus</i>	Cananéia	B
10a	<i>Bacillus pumilus</i>	Cananéia	A
25a	<i>Streptomyces</i> sp.	Cananéia	A
38a	<i>Bacillus subtilis</i>	Cananéia	C
39a	<i>Bacillus subtilis</i>	Cananéia	C
40a	<i>Paenibacillus</i> sp.	Cananéia	C
43a	<i>Paenibacillus</i> sp.	Cananéia	B
57a	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	Cananéia	C
58a	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	Cananéia	B
59a	<i>Paenibacillus macerans</i>	Cananéia	C
60a	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	Cananéia	B
61a	<i>Paenibacillus macerans</i>	Cananéia	B
62a	<i>Bacillus subtilis</i>	Cananéia	B
64a	<i>Paenibacillus macerans</i>	Cananéia	B
67a	<i>Paenibacillus/Bacillus</i>	Cananéia	B
71a	<i>Paenibacillus macerans</i>	Cananéia	B
74a	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	Cananéia	B
76a	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	Cananéia	B
91a	<i>Paenibacillus/Bacillus</i>	Cananéia	B
93a	<i>Bacillus subtilis</i>	Cananéia	C
13b	<i>Paenibacillus macerans</i>	Bertioga	B
14b	<i>Bacillus pumilus</i>	Bertioga	B
20b	<i>Paenibacillus/Bacillus</i>	Bertioga	B
22b	<i>Bacillus sphaericus</i>	Bertioga	A
26b	<i>Paenibacillus macerans</i>	Bertioga	B
27b	Não identificado*	Bertioga	B
28b	Não identificado*	Bertioga	B
33b	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Bertioga	B

*Microorganismos não identificados pela técnica utilizada

Tabela 3. Distribuição taxonômica dos isolados endoglicolíticos da rizosfera de plantas de *R. mangle* localizadas nos diferentes manguezais amostrados.

Filo	Classe	Cananéia	Bertioga
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>
Firmicutes	Bacilli	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Paenibacillus macerans</i>
	Bacilli	<i>Paenibacillus macerans</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
	Bacilli	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>
	Bacilli	<i>Bacillus subtilis</i>	
	Bacilli	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	

Após conhecida a população microbiana rizosférica endoglicolítica associada a *Rhizophora mangle*, e considerando a predominância de bactérias Gram positivas, optou-se por realizar uma amostragem casual de bactérias que não apresentaram tal atividade, com o objetivo de identificar outros componentes da microbiota associada. Tal amostragem evidenciou a presença bactérias Gram negativas e uma diversidade de actinobactérias que não produzem endocelulases, associadas a rizosfera deste hospedeiro (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição taxonômica dos isolados não endoglicolíticos presentes na rizosfera de plantas da espécie *R. mangle*.

Filo	Classe	Espécie
Proteobacteria	α - proteobacteria	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
	α - proteobacteria	<i>Brevundimonas diminuta</i>
	γ - proteobacteria	<i>Acinetobacter</i> sp.
Bacteroidetes	Bacteroidetes	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Microbacterium barkeri</i>
	Actinobacteria	<i>Microbacterium chokolatum</i>
	Actinobacteria	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>
	Actinobacteria	<i>Brevibacterium epidermidis</i>
	Actinobacteria	<i>Streptomyces violaceusniger</i>

5.3 Quantificação da atividade endoglicolítica dos isolados positivos no teste qualitativo

A quantificação da atividade de endoglicanase dos isolados selecionados como produtores a enzima estudada, permitiu através da média dos valores de absorbância obtidos, apontar os isolados com maior produção desta enzima. O isolado 39a, classificado taxonomicamente como *Bacillus subtilis*, apresentou-se como melhor endoglicolítico, seguido do isolado 61a, identificado como *Paenibacillus macerans*, ambos isolados do manguezal localizado na cidade de Cananéia, conforme mostra o gráfico (Figura 7).

Análise Semiquantitativa de Endoglicanase

Figura 7. Análise semiquantitativa da produção de endoglicanase pelos isolados endoglicolíticos obtidos da rizosfera de *Rhizophora mangle*. As barras representam as médias das absorvâncias (n=5) em relação aos isolados e as letras diferentes indicam a diferença estatística significativa (Tukey, $p<0,0001$).

5.4 Caracterização fisiológica do desenvolvimento dos isolados em ambiente salino

A caracterização fisiológica da tolerância ao ambiente salino para o crescimento foi realizada com os isolados celulolíticos em meio sólido e apontou o crescimento das maioria dos isolados avaliados em altas concentrações salinas. Alguns isolados mostraram baixa tolerância ao sal, como os isolados 25a (*Streptomyces* sp.), 33a (*Curtobacterium flaccumfaciens flaccumfaciens*) e 28b (bactéria não identificada), que cresceram apenas em meios de cultivo com até 7% de NaCl. Nos meios de cultivo com concentração de 15% de NaCl observou-se o crescimento da maioria dos isolados (16 no total), enquanto que em meios com 20% de sal cresceram apenas quatro isolados; um classificado como *Paenibacillus lentimorbus* (isolado 60a) e três identificados como pertencentes à espécie *Bacillus subtilis* (isolados 38a, 39a e 93a) (Figura 8).

Figura 8. Crescimento dos isolados avaliados nas diferentes concentrações de NaCl adicionadas ao meio de cultivo. A avaliação do desenvolvimento dos isolados endoglicolíticos foi feita após 7 dias.

A análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de isolados de *Bacillus* sp. e *Paenibacillus* sp. evidenciou alterações morfológicas celulares diretamente relacionadas ao desenvolvimento bacteriano em ambientes com aumento da concentração salina. Observou-se o predomínio de endósporos nas culturas desenvolvidas em meio de cultura com concentrações de 3 a 7% de sal (Figuras 9 e 10). A partir da concentração de 10% de NaCl, observou-se alongamento celular (barras de 2 e 5 μm) e a intensa produção de biofilme (Figuras 11 e 12). Esta formação de biofilme mostrou-se responsiva ao aumento na concentração de sal, sendo acentuada significativamente na concentração de 20% de NaCl, ocasião em que as bactérias já alongadas no sentido longitudinal, aparecem imersas na matriz formada pelo biofilme (Figuras 13 e 14).

Figura 9. Imagem de MEV em aumento de 20.000x (Barra de 2μm), evidenciando endósporos do isolado endoglicolítico 10a crescido em meio sólido por 7 dias suplementado com 3% (0,51M) de NaCl.

Figura 10. Imagem de MEV em aumento de 10.000x (Barra de 2μm), evidenciando endósporos do isolado endoglicolítico 57a crescido em meio sólido por 7 dias suplementado com 7% (1,2M) de NaCl.

Figura 11. Imagem de MEV em aumento de 10.000x (Barra de 2μm) do isolado endoglicolítico 57a evidenciando células vegetativas alongadas e produção de biofilme quando crescido em meio sólido por 7 dias suplementado com 10% (1,7M) de NaCl.

Figura 12. Imagem de MEV em aumento de 4.500x (Barra de 5μm) do isolado endoglicolítico 10a evidenciando células vegetativas alongadas e maior produção de biofilme quando crescido em meio sólido por 7 dias suplementado com 15% (2,5M) de NaCl.

Figura 13. Imagem de MEV em aumento de 10.000x (Barra de 2μm) do isolado endoglicolítico 60a evidenciando células vegetativas envolvidas por densa camada de biofilme quando crescido em meio sólido por 7 dias suplementado com 20% (3,4M) de NaCl.

Figura 14. Imagem de MEV em aumento de 5.000x (Barra de 5μm) do isolado endoglicolítico 60a evidenciando células vegetativas envolvidas por densa camada de biofilme quando crescido em meio sólido por 7 dias suplementado com 20% (3,4M) de NaCl.

5.5 Caracterização funcional do isolado endoglicolítico rizosférico *Bacillus subtilis* – 39a

De maneira adicional às análises anteriores, o isolado 39a (*B. subtilis*) foi caracterizado funcionalmente quanto: (a) ao crescimento em meio líquido contendo diferentes condições salinas; (b) a análise do comportamento quanto à produção de endocelulases, em dois meios diferentes contendo celulose como única fonte de carbono e suplementados com diferentes concentrações salinas; (c) presença do gene *EglA*;

As curvas de crescimento de *Bacillus subtilis* – 39a em várias concentrações salinas são correlacionadas visualmente com o padrão de turvação do meio (Figura 15). Este desenvolvimento evidencia diferentes padrões do desenvolvimento bacteriano frente às diferentes condições de salinidade. Para o meio sem adição de sal ou naqueles com concentrações de 3 e 5% de NaCl, a fase log tem início após duas horas do inóculo inicial. Já para as concentrações de 7, 10 e 15%, a fase log se inicia a partir de 4 horas.

Quando em concentrações salinas de 3, 5 e 7%, observa-se crescimento mais lento e menor densidade celular em relação a ausência de salinidade. As curvas de 10 e 15% seguem ambas o mesmo padrão, no entanto com uma densidade celular inferior às observadas nas concentrações salinas inferiores. Já a curva de desenvolvimento em meio com 20% de NaCl não segue o padrão das demais, sugerindo uma fase log mais tardia, que se inicia em 24 h, porém não se completa (Figura 16).

Figura 15. Tubos de ensaio mostrando diferenças de densidade celular, apontadas pela turbidez do meio de cultura em diferentes salinidades após 60h do inóculo inicial. (A): sem inóculo bacteriano - controle; (B): sem NaCl; (C): 3% NaCl; (D): 5% NaCl; (E): 7% NaCl; (F): 10% NaCl; (G): 15% NaCl e (H): 20% NaCl.

Figura 16. Curvas de crescimento do isolado 39a de *Bacillus subtilis* em meio de cultura com diferentes concentrações salinas. O desvio padrão está representado pelos números que acompanham as curvas.

A MEV evidenciou como previamente descrito para as análises em meio sólido, o alongamento celular e a produção do biofilme, como resposta bacteriana ao aumento da salinidade do meio de cultivo (Figuras 17, 18, 19 e 20).

A atividade de endocelulase foi verificada considerando-se dois diferentes substratos e as várias condições de salinidade (Figura 21). Em meio contendo como substrato a CMC, a bactéria não apresentou crescimento quando em concentrações salinas de 15 e 20%, enquanto que em meio contendo farelo de trigo, houve o desenvolvimento bacteriano mas não houve atividade celulolítica.

Observa-se que no meio CMC, os valores de absorbância, que são diretamente ligados a atividade celulolítica, crescem atingindo seu pico quando as células bacterianas se desenvolvem em meio de cultura contendo 7% de NaCl, decaindo nas concentrações de 10% em diante. Considerando o meio de cultura contendo farelo de trigo, os valores oscilam, porém atinge o seu máximo à concentração de 3%.

Figura 17. Imagem de MEV em aumento de 10.000x (Barra de 2µm) de células vegetativas de *Bacillus subtilis* – 39a crescido em meio líquido sem NaCl por 60 horas.

Figura 18. Imagem de MEV em aumento de 10.000x (Barra de 2µm) de células vegetativas de *Bacillus subtilis* – 39a evidenciando discreto alongamento celular quando crescido em meio líquido por 60 horas suplementado com 5% (0,8M) de NaCl.

Figura 19. Imagem de MEV em aumento de 20.000x (Barra de 2µm) de células vegetativas de *Bacillus subtilis* – 39a evidenciando alongamento celular e produção de exopolissacarídeos (biofilme) quando crescido em meio líquido por 60 horas suplementado com 20% (3,4M) de NaCl.

Figura 20. Imagem de MEV em aumento de 100x (Barra de 200µm) de cristal de NaCl, presente em grande quantidade em meio líquido suplementado com 20% (3,4M) de NaCl.

Figura 21. Dosagem semiquantitativa da atividade endoglicolítica de *Bacillus subtilis* (isolado 39a) em meios de cultura contendo farelo de trigo e CMC e sob diferentes concentrações de NaCl. As barras representam as médias das absorbâncias em relação às concentrações salinas e as letras diferentes indicam a diferença estatística significativa (Teste de Tukey, $p < 0,01$).

Para ligar a atividade endoglicolítica a componentes do genoma bacteriano, foi realizada a amplificação do gene *EglA* com *primers* específicos, observando-se um fragmento de 1206pb nos isolados que continham este gene. Dos isolados endoglicolíticos obtidos, 61% apresentaram produtos de amplificação referente ao gene.

6 DISCUSSÃO

Os manguezais estudados no presente trabalho apresentam claras diferenças em relação as condições ambientais disponíveis para o desenvolvimento da biota associada. O manguezal de Bertioga sofreu em 1983 um importante derramamento de petróleo, cujo impacto permanece ainda hoje. Em contrapartida, o manguezal localizado na cidade de Cananéia faz parte do Parque Estadual da Ilha do Cardoso - PEIC, e portanto consiste em ambiente preservado. Ao visitar os dois ambientes, percebe-se de imediato as diferenças, onde o ambiente preservado mostra macrofauna e macroflora mais presentes e vistosas, com maior riqueza e distribuição das árvores de mangue. Desta forma, podemos imaginar que a comunidade microbiana localizada no manguezal impactado foi também alterada e ainda passa por processo de re-estruturação.

Os dados obtidos neste trabalho mostram que essas diferenças também são válidas para as comunidades microbianas. Al-Sayed et al. (2005), mostram em seu estudo que o impacto promovido pelo homem pode mudar a estrutura da microbiota nativa, bem como alterar a composição florística do ecossistema.

Em relação à microbiota rizosférica associada a *R. mangle*, os dados deste trabalho mostram uma maior densidade bacteriana e uma melhor atividade endoglucolítica dos isolados obtidos de plantas coletadas no manguezal de Cananéia. Adicionalmente, uma maior diversidade de espécies ocorre nesse ambiente. Tais fatos sugerem o equilíbrio do ecossistema como principal responsável pela riqueza de espécies e suas atividades funcionais. Isso é reforçado por Cury (2002), que após estudo do manguezal de Bertioga, afirmou que a poluição produziu um decréscimo na abundância de espécies, em função da extinção de microrganismos não adaptados ao estresse imposto. Assim sendo, os microrganismos que são sabidamente produtores primários, secundários e decompositores, cujas atividades fotossintéticas, litotróficas e organotróficas contribuem para o equilíbrio do ambiente, compõem e mantêm a estabilidade do ecossistema através de mecanismos cíclicos, conservando todas as outras formas de vida (AL-SAYED et al., 2005).

Dentre os isolados obtidos que mostraram atividade de endocelulase, é possível observar a dominância dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*, tanto no manguezal de Bertioga quanto no de Cananéia. As espécies *P. macerans* e *Bacillus pumilus* aparecem nos dois ambientes, enquanto que *Bacillus subtilis* e *P. lentimorbus* aparecem somente em Cananéia. Apenas um único isolado de *Bacillus athrophaeus* aparece dentre os celulolíticos de Bertioga. Outros

autores relatam a presença significativa de *Bacillus* associado às plantas de mangue. Holguin et al. (2001) isolaram de *Avicennia marina* em manguezal preservado no México, exemplares de *B. athrophaeus* e *Paenibacillus macerans* solubilizadores de fosfato e Maciel-Souza e colaboradores (2006), obtiveram *Bacillus* degradadores de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAH), isolados da rizosfera de *R. mangle* e *Laguncularia racemosa* de um manguezal contaminado com petróleo no Rio de Janeiro – Brasil. Segundo Ivanova et al. (1996), muitas espécies de *Bacillus* são frequentemente isoladas de ambientes aquáticos, como *B. cereus*, *B. firmus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. marinus* e *B. pumilus*, sendo os últimos quatro, habitantes comuns do Oceano Pacífico.

Daane et al. (2001) e Gontang (2007) descrevem várias linhagens de *Bacillus* spp. e *Paenibacillus* spp. isoladas de *Spartina alterniflora* e sedimentos de manguezais.

Assim como no ambiente terrestre, percebe-se uma riqueza de microrganismos na rizosfera de plantas de ambientes aquáticos. O trabalho de Cunha et al. (2005), mostra uma maior quantidade de microrganismos associados à rizosfera de *Halimione portulacoides* em ambiente estuarino em Portugal, quando comparada ao sedimento e à coluna d'água. Tal riqueza de microrganismos é representada por bactérias que apresentam recursos metabólicos de importância nas mais variadas áreas, como observado para os *Bacillus*, que são produtores de vários metabólitos secundários de interesse industrial, agrícola e biotecnológico.

No entanto, a rizosfera também é reservatório de bactérias potencialmente patogênicas à espécie humana (BERG et al., 2005) e às espécies vegetais, como as rizobactérias deletérias (NEHL, et al., 1996). Das bactérias não celulolíticas isoladas e identificadas, foram obtidas algumas que são conhecidas por causarem doenças em humanos, como *Acinetobacter calcoaceticus*, *Ochrobactrum anthropi*, *Sphingobacterium spiritivorum* (BERG et al., 2005) e em plantas, como *Curtobacterium flaccumfaciens flaccumfaciens* (patógeno de *Phaseolus vulgaris*) (UESUGI, 2003).

As actinobactérias segundo Zahran (1997), representam uma pequena fração dos microrganismos isolados de ambientes salinos, o que é contradito por Takeuchi e Hatano (2001), que afirmam ser a rizosfera de manguezais uma fonte rica para o isolamento de actinobactérias. Em trabalho mais recente, outro panorama é oferecido por Gontang (2007), que isolou uma grande variedade de actinobactérias de sedimentos da República de Palau, dentre os quais *Brevibacterium epidermidis*, *Micrococcus* spp. e várias linhagens de *Streptomyces*. De maneira comparativa, nos manguezais avaliados no presente estudo, foram isoladas sete diferentes actinobactérias: *Microbacterium barkeri*, *Microbacterium chocolatum*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Brevibacterium epidermidis*, *Streptomyces*

violaceusniger, *Streptomyces* sp. e *Curtobacterium flaccumfaciens flaccumfaciens*, das quais apenas as duas últimas apresentaram atividade endoglucolítica.

A atividade celulolítica dos manguezais é de grande importância. Apesar de os manguezais serem relativamente pobres em disponibilidade de nitrogênio e fósforo, sua produtividade é alta em função da ciclagem de nutrientes promovida pelos microrganismos a partir da decomposição das folhas. Desta forma, as folhas e a madeira das árvores de mangue são os principais componentes degradados por microrganismos celulolíticos nesse ecossistema. A degradação de folhas caídas das árvores inicia imediatamente após sua colonização por fungos e bactérias do sedimento e a população de bactérias heterotróficas com atividade celulolítica, pectinolítica, proteolítica, e amilolítica é responsável pela atividade degradativa do manguezal (HOLGUIN et al., 2001).

As bactérias isoladas de Bertioga e Cananéia com atividade endoglucolítica devem participar ativamente no processo de transformação do material vegetal, reduzindo os compostos celulósicos (iniciando pela produção da endocelulase, que destrói a parede celular vegetal) a compostos de baixo peso molecular, que deverão ser metabolizados pelas bactérias anaeróbias presentes no sedimento. Como a endoglicanase é uma enzima indutível por substrato específico (celulose) (VICENTE, 1979), pode-se propor que a atividade celulolítica obtida *in vitro* representa uma amostra do que ocorre nos manguezais, resguardando-se obviamente as diferenças concernentes ao estudo *ex situ*.

A melhor *performance* na produção de endocelulase foi encontrada entre as bactérias de Cananéia e isso reforça, como já comentado, que o impacto ambiental pode inferir qualitativamente no metabolismo microbiano. Os microrganismos celulolíticos requerem para o crescimento essencialmente, nitrogênio, fósforo e enxofre, além de macro e micronutrientes e vitaminas. A degradação aeróbia da celulose é altamente dependente do oxigênio e da disponibilidade de matéria orgânica, além de requerer pH próximo da neutralidade (LYND et al., 2002). Isto justifica os melhores resultados com isolados de Cananéia, sendo que este ambiente oferece melhores condições para esta atividade degradativa, em especial para a oxigenação e o pH. De maneira adicional, as bactérias de Bertioga podem utilizar como recurso primário para a obtenção de carbono, outras moléculas, que ocorrem apenas em ambientes contaminados por petróleo. Isto pode levar ao desenvolvimento de sistemas enzimáticos especializados e rotas metabólicas para a degradação de compostos sintéticos ou recalcitrantes (TAN, 1999).

Outra característica a ser considerada ao acessar processos biológico em ambientes de manguezal é a flutuação que ocorre nos níveis de salinidade neste ambiente. Ambientes

salinos naturais são aqueles que apresentam salinidade entre 4 e 30% de NaCl e são encontrados no âmbito terrestre e aquático. Esses ambientes apresentam uma microbiota bacteriana característica, com capacidade de crescer ou tolerar concentrações altas de sais, classificadas como comunidades bacterianas halófilas e halotolerantes (ZAHARAN, 1997).

Dos manguezais estudados, obteve-se isolados que crescem bem em meio sólido com ou sem a adição de NaCl. A tolerância máxima para o crescimento variou entre 7% e 20% . O crescimento ao valor máximo de 7% esteve restrito às actinobactérias, corroborando com resultados que mostram que, salvo algumas exceções, estas espécies são menos tolerantes ao ambiente salino (ZAHARAN, 1997). No entanto, quando consideradas as espécies de *Bacillus*, a tolerância a concentrações de até 24% de sal foi verificada.

Considerando os resultados de crescimento em meio salino e a compatibilidade destes com trabalhos anteriores (VENTOSA et al., 1998), fica evidenciado que os isolados endoglícolíticos de Cananéia e Bertioga são halotolerantes, condição que coincide com o teor de salinidade dos habitats naturais, cujos valores não excedem 3% de NaCl. Cumpre salientar que o comportamento salino dessas rizobactérias representa um equilíbrio com as plantas hospedeiras (*R. mangle*), que dentre a vegetação do manguezal, apresentam-se como halófitas facultativas não secretoras, tolerando salinidades de até 5,5%, com ótimo de crescimento próximo a 3,5% de NaCl. As raízes subterrâneas se encarregam de filtrar a água que é absorvida e ainda o acúmulo inevitável de sal, pode ser descartado pelas lenticelas e pelas folhas (DAWES, 1997), através da transpiração cuticular (FRUEHAF, 2005). Tal característica metabólica permite a sobrevivência da planta e de seus microrganismos associados, uma vez que a atividade microbiana da rizosfera está sujeita às modificações promovidas pela planta através de seu metabolismo (fotossíntese e translocação de fotossintatos) (EL-SHATNAWI e MAKHADME, 2001).

Quando a resposta celular bacteriana foi monitorada por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar as modificações morfológicas características de adaptação à salinidade. Zahran (1997) relatou previamente, modificações na estrutura celular de *Bacillus* e *Staphylococcus* quando submetidos a concentrações de 10% de NaCl, tendo com o principais respostas o alongamento e espessamento celular, com formação de estreptobacilos. Resposta similar foi verificada no presente estudo, sendo o alongamento e o espessamento celular devidos à acumulação de solutos compatíveis, que promovem o equilíbrio osmótico e estabilizam as proteínas celulares (SLEATOR e HILL, 2001). Isso ocorre em função de que os solutos osmoticamente ativos provocam um aumento da

osmolaridade do citoplasma, que é acompanhado do influxo de água para dentro das células (CSONKA, 1989).

As imagens revelaram ainda, a presença de endósporos a concentrações de 3 e 5%, o que também foi observado por Zahran (1997) a partir da visualização de células de *Bacillus* sp.. A produção de endósporos é sabidamente induzida pela indisponibilidade de nutrientes e pelas variações das condições ambientais. No entanto, a produção de endósporos em concentrações de sal ótimas ao crescimento desta bactéria, sugere a salinidade como mecanismo indutor da produção dessa estrutura de resistência. Wood et al. (2001) corroboram ainda em outro detalhe observado nas imagens, onde não se percebe a formação de endósporos a concentrações acima de 5% de NaCl. Isso acontece em função de que a alta osmolaridade inibe a esporulação a partir da inibição da cascata de sinais que controlam os fatores de transcrição do processo.

Outra modificação celular observada foi a presença de biofilme quando em concentrações a partir de 10% de NaCl. Os biofilmes microbianos são formados a partir de EPS (exopolissacarídeos) em várias condições e uma delas, segundo Nichols et al. (2005), é em resposta a fatores físicos como o *stress* osmótico em bactérias do ambiente aquático. A presença do biofilme aumenta a habilidade dos microrganismos em competir e sobreviver em ambientes que apresentam alterações das condições ambientais. A camada de exopolissacarídeos que envolve a célula atua como uma barreira às mudanças osmóticas do ambiente (NICHOLS et al., 2005), o que é característica do ecossistema de manguezais.

De maneira mais específica, as curvas de crescimento de *Bacillus subtilis*-39a em meio líquido com diferentes concentrações salinas, mostraram distintos padrões de crescimento. As alterações no início da fase exponencial sugere ser a osmoregulação facilitada quando em baixas concentrações salinas, provavelmente efetuada por rápida importação de K^+ . Nas concentrações a partir de 7%, a fase *log* tem início retardado, fato também observado por López et al. (2006), que relacionou esse evento aos mecanismos de osmoregulação, que retardam o início da divisão celular, a partir do qual a célula passa a acumular ou sintetizar osmoprotetores. Uma vez adaptada ao *stress*, a bactéria continua seu ciclo, passando para a fase estacionária ou possivelmente reiniciando uma fase de divisão celular. Assim sendo, percebe-se um ótimo de crescimento em concentração de 3% de NaCl com tolerância satisfatória a 5, 7 e 10% o que caracteriza a bactéria como extremamente halotolerante, característica inerente à maioria das espécies deste gênero (VENTOSA et al., 1998).

No *stress* salino, o NaCl age como importante indutor de um conjunto de várias proteínas, em especial as proteínas *stress*-específicas. Em condições hipersalinas com

ausência de qualquer osmoprotetor exógeno, *Bacillus subtilis* rapidamente acumula íons K^+ . Em um segundo momento, acumula osmoprotetores através de síntese ou absorção do ambiente. Os osmoprotetores utilizados por *Bacillus subtilis* são prolina e glicina betaína. A prolina é sintetizada e a glicina-betaína (derivado trimetilado de glicina) pode ser absorvida do ambiente ou sintetizada à partir de colina, seu precursor. O acúmulo de glicina-betaína contrabalança a alta concentração extracelular e ajuda a manter o turgor celular (Boch, *et al.*, 1994). Ikeuchi et al. (2003) realizaram experimentos de indução de tolerância a sais com *Bacillus subtilis* e propuseram a utilização de glutamato e sorbitol como osmoprotetores, pela bactéria.

A quantificação da atividade endoglicolítica em diferentes substratos e salinidades permitiu avaliar o perfil de crescimento da bactéria em diferentes salinidades utilizando duas fontes de carbono diferentes e ainda determinar a atividade de endocelulase, considerando a salinidade como variável.

Nas concentrações de 15 e 20% de NaCl, a bactéria não apresentou crescimento quando em meio CMC e cresceu em meio farelo de trigo mas não apresentou atividade de celulase, o que permite concluir que a celulose não é o substrato adequado utilizado pelo microrganismo como fonte de carbono quando em condições extremas de osmotolerância. Na utilização de celulose como única fonte de carbono a bactéria se comporta apenas como halotolerante e não como halotolerante extrema.

Já em relação à produção de endocelulase, os melhores resultados aparecem à concentração de 3% quando o substrato é farelo de trigo e à 7% quando o substrato é CMC. Ainda ligando estes resultados podemos inferir sobre a ecologia das bactérias avaliadas no ambiente rizosférico. Uma vez que o aumento da salinidade induz a formação de biofilme, além da diminuição da atividade endoglicolítica, se assumirmos a matriz do biofilme como composta por exopolissacarídeos (substrato para a ação de endoglicanases), podemos sugerir um sistema de regulação para a aderência das células bacterianas à biofilmes, regulada pela salinidade do ambiente.

7 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos com a metodologia adotada mostram um efeito impactante sobre a comunidade bacteriana associada às plantas de *R. mangle* presentes no município de Bertioga, quando comparadas àquelas localizadas no manguezal de Cananéia;
- *Bacillus* e *Paenibacillus* representam, nas condições adotadas, os microrganismos com maior frequência de isolamento da rizosfera de *R. mangle*;
- *Bacillus* e *Paenibacillus* representam as espécies cultiváveis endoglícolíticas mais abundantes na rizosfera de *R. mangle*;
- Os isolados obtidos são classificados como halotolerantes extremos, apesar de estarem associados a uma halófito facultativa e habitarem ambiente com baixos teores de salinidade;
- A melhor *performance* quanto à produção de endocelulase e ao crescimento em altas concentrações de NaCl foi do isolado 39a de *Bacillus subtilis*;
- A tolerância bacteriana à salinidade foi reduzida quando em fonte de carbono complexa como a celulose;
- O farelo de trigo demonstrou ser o melhor substrato para a atividade de endocelulase em concentração salina de 3% e carboximetilcelulose foi consumida com eficiência em 7%;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, Z.; BANU, H.; RAHMAN, M. M.; AKHTER, F.; HAQUE, S. Microbial activity on the degradations of lignocellulosic polysaccharides. **OnLine Journal of Biological Sciences**, v. 1, p. 993-997, 2001.

ALMEIDA, R. Ecologia de manguezais: dinâmica da serapilheira e funcionamento do ecossistema, Ilha do Cardoso, Cananéia, São Paulo, Brasil. São Paulo, 2005. 183f. Tese (Doutorado) – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

AL-SAYED. H.; GHANEM, E. H.; SALEH, K. M. Bacterial community and some physico-chemical characteristics in a subtropical mangrove environment in Bahrain. **Marine Pollutions Bulletin**, v. 50, p. 147-155, 2005.

ÂNGELO, R. S. Enzimas hidrolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs., p. 263-265, 2004.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. **Trees**, v. 16, p. 159-166, 2002.

BERG, G., EBERL, L., HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 1673-1685, 2005.

BIBER, P. D. Measuring the effects of salinity stress in the red mangrove, *Rhizophora mangle* L. **African Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 1-4, 2006.

BLASCHECK, W.; KÄSBAUER, J.; KRAUS, J.; FRANZ, G. *Pythium aphanidermatum*: culture, cell-wall compositions and isolation and structure of antitumour storage and solubilised cell-wall (1→3),(1→6)-β-D-glucans. **Carbohydrate Research**, v. 231, p. 293-307, 1992.

BOCH, J.; KEMPF, J. B.; BREMER, E. Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 5364-5371, 1994.

CHEN, Y. M.; WANG, M. K.; ZHUANG, S. Y.; CHIANG, P. N. Chemical and physical properties of rhizosphere and bulk soils of three tea plants cultivated in Ultisols. **Geoderma**, v. 136, p. 378-387, 2006.

CLEMENTE, A. R. Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por fungos ligninolíticos e sua aplicação na biorremediação de solos contaminados. Campinas, SP, 2002. 159f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CSONKA, L. N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. **Microbiological Reviews**, v. 53, p. 121-147, 1989.

CUNHA, M. A.; PEDRO, R.; ALMEIDA, M. A.; SILVA, M. H Activity and growth efficiency of heterotrophic bacteria in a salt marsh (Ria de Aveiro, Portugal). **Microbiological Research**, v. 160, p. 279-290, 2005.

CURY, J. C. Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo. Piracicaba, 2002. 84f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

DAANE, L. L.; HARJONO, I.; ZYLSTRA, G. J.; HÄGBLOOM, M. M. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2683-2981, 2001.

DAWES, C. J. **Marine Botany**. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, 267-302p. 1998.

EL-SHATNAWI, M. K. J.; MAKHADME, I. M. Ecophysiology of the plant-rhizosphere system. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v. 187, p. 1-9, 2001.

EYSINK, G. G. J.; POFFO, I. R. F. Recuperação de manguezais – proposta pedagógica para programas de educação ambiental. In: HAMMER, V. S. **Educação Ambiental para o desenvolvimento sustentável**. Brasília. Embrapa Informática e Tecnologia, 2002. v.5, 130p.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, p. 215-242, 2004.

FRUEHAF, S. P. *Rhizophora mangle* (mangue vermelho) em áreas contaminadas de manguezal na Baixada Santista. Piracicaba - SP, 2005. 223f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

GAMERO, R. M. P. Mineralogia, físico-química e classificação dos solos de mangue do rio Iiri no canal de Bertioga (Santos, SP). Piracicaba - SP, 2001. 78f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

GONTANG, E. A.; FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 3272-3282, 2007.

HECENE, H.; RAFA, F.; CHEBHOUNI, N.; BOUTAIBA, S.; BHATNAGAR, T. BARATTI, J. C.; OLLIVIER, B. Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt lake, Algerian Sahara. **Journal of Arid Environments**, v. 58, p. 273–284, 2004.

HOLGUIN, G.; BASHAN, Y.; MENDOZA-SALGADO, R.; AMADOR, E.; TOLEDO, G.; VÁZQUEZ, P.; AMADOR, A. La microbiología de los manglares. Bosques en la frontera entre el mar y la tierra. **Ciencia y Desarrollo**, p. 26-35, 1999.

HOLGUIN, G.; VASQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, p. 265-278, 2001.

IKEUCHI, T.; ISHIDA, A.; TAJIRI, M.; NAGATA, S. Induction of salt tolerance in *Bacillus subtilis* IFO 3025. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, p. 184-186, 2003.

IVANOVA, E. P.; VYSOTSKII, M. V.; SVETASHEV, V. I.; NEDASHKOVSKAYA, O. I.; GORSHKOVA, N. M.; MIKHAILOV, V. V.; YUMOTO, N.; SHIGERI, Y.; TAGUSHI, T.; YOSHIKAWA, S. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. **International Microbiology**, v. 2, p. 267-271, 1999.

KAMOUN, S. Molecular genetics of pathogenic Oomycetes. **Eukaryotic Cell**, v. 2, p. 191–199, 2003.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, v. 40, p. 81-251, 2001.

LIMA, A. O. S.; QUECINE, M. C.; FUNGARO, M. H. P.; ANDREOTE, F. D.; MACCHERONI JR., W.; ARAÚJO, W. L.; SILVA-FILHO, M. C.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. AZEVEDO, J. L. Molecular characterization of a β -1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 68, p. 57-65, 2005.

LÓPEZ, C. S.; ALICE, A. F.; HERAS, H.; RIVAS, E. A.; SÂNCHEZ-RIVAS, C. Role of anionic phospholipids in the adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. **Microbiology**, v. 152, p. 605-616, 2006.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

MACIEL-SOUZA, M. C.; MACRAE, A.; VOLPON, A. G. T.; FERREIRA, P. S.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Chemical and microbiological characterization of mangrove sediments after a large oil-spill in Guanabara Bay – RJ – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 262-266, 2006.

MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. **Reviews in Environmental Science & Biotechnology**, v. 1, p. 105-114, 2002.

MARINGONI, A. C.; CÂMARA, R. C. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* detection in bean seeds using a semi-selective culture medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 451-455, 2006.

MASSEL, S. R.; FURUKAWA, K.; BRINKMAN, R. Surface wave propagation in mangrove forests. **Fluid Dynamics Research**, v. 24, p. 219-249, 1999.

MCCARTHY, A. J. Lignocellulose-degradind actinomycetes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, p. 145-163, 1987.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA. 1998. v. 1, p. 17-67.

MELO, I. S. Isolamento de agentes de biocontrole da rizosfera. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA. 2000. v. 3, p. 15-39.

MELO, I. S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998, p. 87-116.

NEHL, D. B.; ALLEN, S. J.; BROWN, J. F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v. 5, p. 1-20, 1996.

NICHOLS, C. A. M.; GUEZENNEC, J.; BOWMAN, J. P. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the Southern Ocean, Sea Ice, and Deep Sea hydrothermal vents: A review. **Marine Biotechnology**, v. 7, p. 253-271, 2005.

OREN, A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology and applications. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, p. 56-63, 2002.

POMETO III, A.; CRAWFORD, D. L. Effects of pH on lignin and cellulose degradation by *Streptomyces viridosporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 246-250, 1986.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade de celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 205-211, 2004.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M. L. G.; DE-ROSA, T. Brazilian mangroves. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 3, p. 561-570, 2000.

SLEATOR, R. D.; HILL, C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 49-71, 2001.

TAKEUCHI, M.; HATANO, K. *Agromyces luteolus* sp. nov., *Agromyces rhizospherae* sp. nov., from the mangrove rhizosphere. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 51, p. 1529-1537, 2001.

TAKEUCHI, M.; HATANO, K. *Gordonia rhizosphera* sp. nov. isolated from the mangrove rhizosphere. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 907-912, 1998.

TAM, N. F. Y.; GUO, C. L.; YAU, W. Y.; WONG, Y. S. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 316-324, 2002.

TAN, H. M. Bacterial catabolic transposons. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 51, p. 1-12, 1999.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied Environmental Microbiology**, v. 43, p. 777-780, 1982.

THRANE, C.; TRONSMO, A.; JENSEN, D. F. Endo-1,3- β -glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: purification and partial characterization, induction of and biological against plant pathogenic *Pythium* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, p. 331-344, 1997.

TREVORS, J. T. Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically contaminated soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 101, p. 45-67, 1998.

UESUGI, C. H.; FREITAS, M. A.; MENEZES, J. R. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em Feijoeiro, em Goiás e no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 324, 2003.

VEIGA, M.; ESPARIS, A.; FABREGAS, J. Isolation of cellulolytic Actinomycetes from marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, p. 286-287, 1983.

VENTOSA, A.; NIETO, J. J.; OREN, A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 504-544, 1998.

VICENTE, V. A. Isolamento e seleção de fungos ligninocelulolíticos. Piracicaba - SP, 1979. 173f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

WALKER, T. S.; BAIS, H. P.; GROTEWOLD, E.; VIVANCO, J. M. Root Exudation and Rhizosphere Biology. **Plant Physiology**, v. 132, p. 44–51, 2003.

WARREN, R. A. J. Microbial hydrolysis of polysaccharides. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 50, p. 183-212, 1996.

WIRTH, S. J., WOLF, G. A. Micro-plate colourimetric assay for *endo*-acting cellulose, xylanase, chitinase, 1,3- β -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 24, p. 511-519, 1992.

WIRTH, S.; ULRICH, A. Cellulose-degrading potentials and phylogenetic classification of Carboxymethyl-cellulose decomposing bacteria isolated from soil. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, p. 584-591, 2002.

WOOD, J. M.; BREMER, M.; CSONKA, L. N.; KRAEMER, R.; POOLMAN, B.; VAN DER HEIDE, T.; SMITH, L. T. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 437-470, 2001.

ZAHARAN, H. H. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, p. 211-223, 1997.