LUCIANA APARECIDA AVILA

**DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
Pseudomonas spp. DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2012

LUCIANA APARECIDA AVILA

**DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
Pseudomonas spp. DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Itamar Soares de Melo

Versão Original

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Avila, Luciana Aparecida.

Diversidade e potencial biotecnológico de *Pseudomonas* spp. de sedimentos de manguezais / Luciana Aparecida Avila. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Itamar Soares de Melo.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Microbiologia ambiental

Versão do título para o inglês: Diversity and biotechnological potential of *Pseudomonas* spp. from mangrove sediments.

Descritores: 1. Manguezal 2. *Pseudomonas* 3. Regulador global de resposta *gacA* 4. DGGE 5. Estresse salino 6. Biofertilizantes I. Melo, Itamar Soares de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB019/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Luciana Aparecida Avila.

Título da Tese: Diversidade e potencial biotecnológico de *Pseudomonas* spp. de sedimentos de manguezais.

Orientador(a): Itamar Soares de Melo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Embrapa Meio Ambiente
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Certificado de isenção

PROTOCOLO DE PESQUISA Nº: 04/2012

Data de entrada: 18/01/2012

Título: Diversidade e potencial biotecnológico de *Pseudomonas spp.* de sedimentos de manguezais

Pesquisador(a) responsável: Luciana Aparecida Avila

Pesquisadores envolvidos: Itamar Soares de Melo

Certificamos que o Protocolo CEUA-EMA no. 04/2012, referente ao projeto intitulado “Diversidade e potencial biotecnológico de *Pseudomonas spp.* de sedimentos de manguezais” sob a responsabilidade de Luciana Aparecida Avila foi analisado pela CEUA da Embrapa Meio Ambiente, tendo sido constatado que o referido projeto não envolve manipulação animal que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos pela Comissão.

Local e Data: Jaguariuna, 01 / 02 / 2012

Assinatura: _____

Vera Lúcia de Castro
Presidente CEUA EMA

À minha mãe,

Maria Zenaide da Silva,

pelo amor, apoio e incentivo de sempre.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Ao Prof. Dr. Itamar Soares de Melo, pela oportunidade, orientação, estímulo e amizade.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, pela co-orientação e apoio no desenvolvimento da tese.

À minha mãe, Maria Zenaide da Silva, por todo o amor, confiança e incentivo, todo o sacrifício em prol do meu desenvolvimento; e a toda minha família pelo incentivo.

Ao meu namorado, Hugo Lee, por toda ajuda, dedicação, compreensão, paciência, apoio e incentivo.

A todos os amigos e colegas que já passaram pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, que muito me ensinaram nestes nove anos na Empresa. Agradeço pela amizade, apoio, carinho e incentivo: Luciana Frias Reyes, Flávia Melo, Sarah Canova, Mariana Lotto, Zayame V. Pinto, Élide Corrêa, Liliana, Tiago Zucchi, Pietro Agostini, João Paulo Tozzi, Eduardo Bernardo, Eduardo Gottardo, Harllen Sandro da Silva, Marise T. Suzuki, César Terrasan, Marcela Galo, Ivo, Mateus, Vitor, Pablo Oliveira, Harrison (Tom), Camila, Alex Moretini, Armando Dias, Francisco Gueler e Francisco E. Costa.

Aos amigos e atuais companheiros de trabalho do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, pela amizade, apoio e momentos de descontração: Micheli, Regiane (Figura), Regiane (Xuxa), Natália Franco, Natália Carvalhães, Cassiano Forner, Rodrigo Estevan, Jaime, Rafael Silva, Vinícius, Fernanda Oliveira, Giulia Milan, Miriam Sáber, Zayame Vegete, Alexandre Visconti (Tiozinho), Flávia Mandolesi, e um agradecimento especial àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho: Wallace, Oswaldo, Leonardo Silva, Milena e às minhas amigas-irmãs Vanessa Nessner e Suikinai Nobre.

À Profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira do CPQBA da Unicamp pelo sequenciamento.

Aos Pós-Doutorandos Angela Valente, Rodrigo Taketani, pela ajuda, atenção e colaboração neste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Rodrigo Mendes, pela atenção de sempre e disponibilidade em ajudar e orientar.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, Roseli, Márcia, Elke, Tatiana e João Luiz, pelo apoio e em especial as amigas Roseli, Márcia e Elke, exemplos de dedicação ao próximo e ao trabalho, agradeço pelo carinho e disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários do Setor de Campos Experimentais (P-10) da Embrapa Meio Ambiente, pelo auxílio durante a realização do estudo em casa-de-vegetação.

Aos funcionários da Secretaria de Biotecnologia da USP (Eliane, Fábria e Marcos) pela atenção, disposição e apoio administrativo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado.

À Universidade de São Paulo (ICB) pela minha formação e por todas as oportunidades.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

“O papel dos infinitamente pequenos é infinitamente grande.”

Louis Pasteur

RESUMO

AVILA, L. A. Diversidade e potencial biotecnológico de *Pseudomonas* spp. de sedimentos de manguezais. 2012. 129 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Os manguezais possuem condições ambientais únicas, sendo composto por espécies particulares de plantas, animais, protozoários e micro-organismos, que interagem neste ambiente caracterizado pela interface entre o continente e o oceano em regiões intertropicais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade e o potencial biotecnológico da comunidade de *Pseudomonas* spp. em sedimentos de manguezais do Estado de São Paulo. Para tanto, amostras de sedimentos de distintos manguezais foram avaliadas, sendo; *i*) manguezal contaminado com petróleo em Bertioga, *ii*) manguezal sem contaminação em Bertioga *iii*) manguezal preservado de Cananéia. Inicialmente foi realizada uma prospecção do gene *gacA* entre os isolados de sedimentos de manguezais e então, avaliação da atividade antimicrobiana e síntese de enzimas pelas linhagens selecionadas. A diversidade de *Pseudomonas* spp. foi avaliada por meio da detecção do gene 16S rRNA e do gene *gacA* de isolados de *Pseudomonas*, como também por métodos independentes de cultivo (eletroforese em gel com gradiente de desnaturação - DGGE e construção de biblioteca de clones). Estudos foram realizados para avaliar o potencial de *Pseudomonas* para promoção de crescimento de milho e redução dos efeitos do estresse salino sobre a planta. Dos 83 isolados obtidos, 55 (66,27%) foram positivos para o gene *gacA*. Com base no gene 16S rRNA e perfil de ácidos graxos da membrana celular somente 29 isolados puderam ser caracterizados em espécie e outros 13 caracterizadas como *Pseudomonas* sp. Extratos bruto de linhagens de *Pseudomonas* sp. demonstraram atividade antifúngica e antibacteriana de amplo espectro. Todas as linhagens selecionadas produziram as enzimas catalase, celulase, lacase e lipase. No estudo da estrutura da comunidade de *Pseudomonas* spp. pela análise do DGGE do 16S rRNA, foi possível observar perfis de bandas distintos em cada um dos manguezais e pontos amostrados, enquanto que para a análise baseada no gene *gacA*, as bandas mostraram-se distribuídas de maneira aleatória entre as amostras analisadas. De acordo com a análise da biblioteca de clones, os diferentes manguezais apresentam comunidades de *Pseudomonas* spp. bem distintas, corroborando com resultado da análise de RDA dos perfis de DGGE. Aproximadamente 60% dos clones de sedimentos de manguezais não puderam ser caracterizados pelo gene 16S rRNA. Entre as espécies caracterizadas, *P. nitroreducens* e *P. fluorescens* foram predominantes. *Pseudomonas* de sedimentos de manguezais halotolerantes produzem AIA, ACC deaminase, NH₃, solubilizam fosfato e fixam nitrogênio. *Pseudomonas* sp. selecionadas promoveram o crescimento de milho, estimulando também o desenvolvimento das plantas cultivadas sob estresse salino. Este trabalho enfatiza a importância de manguezais para obtenção de bactérias com potencial agrícola, industrial e biotecnológico.

Palavras-chave: Manguezal, *Pseudomonas*, Regulador global de resposta *gacA*, DGGE, Biblioteca de clones, Biofertilizantes, Estresse salino.

ABSTRACT

AVILA, L. A. Diversity and biotechnological potential of *Pseudomonas* spp. from mangrove sediments. 2012. 129 p. Ph. D. thesis (Biotechnology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Mangroves possess unique environmental conditions, harboring particular species of plants, animals, protozoa and microorganisms that interact in this environment that is characterized by the interface of continent and ocean in intertropical regions. The objective of this study was to evaluate the diversity and biotechnological potential of *Pseudomonas* spp. community in mangrove sediments of São Paulo state. Sediment samples from different mangroves were evaluated as follows; *i*) oil-contaminated mangrove in Bertioga, *ii*) uncontaminated mangrove in Bertioga, *iii*) preserved mangrove in Cananéia. Initially, the prospection of *gacA* gene was performed between the isolates of mangrove sediments and then the evaluation of antimicrobial activity and enzyme synthesis by the selected strains. *Pseudomonas* spp. diversity was analyzed through the detection of 16S rRNA gene and *gacA* gene of *Pseudomonas* isolates, as well as through unculturable methods (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE and clone library construction). Studies were conducted to analyze the potential of *Pseudomonas* for maize growth promotion and reduce the effects of salt stress on the plant. Of the 83 isolates, 55 (66,27%) were positive for *gacA* gene. Based on 16S rRNA and fatty acid profile of the cell membrane, only 29 isolates could be characterized at species level and 13 were characterized as *Pseudomonas* sp. Crude extracts of *Pseudomonas* sp. strains demonstrated broad spectrum antifungal and antibacterial activities. All selected strains produced the enzymes catalase, cellulase, laccase and lipase. In the study of community structure of *Pseudomonas* spp. by DGGE using 16S rRNA, it was possible to observe different band profiles in each of the mangroves and sample points, while for the *gacA* gene-based, the bands were randomly distributed within samples. According to clone library analysis, the different mangroves showed very distinct *Pseudomonas* spp. communities, corroborating with the results of RDA analysis of DGGE. Approximately 60% of the clones from mangroves sediments could not be characterized by 16S rRNA gene. Among the characterized species, *P. nitroreducens* and *P. fluorescens* were dominant. *Pseudomonas* mangrove halotolerant produce IAA, ACC deaminase, NH₃, solubilize phosphate and fix nitrogen. Selected *Pseudomonas* sp. were able to promote maize growth, also stimulating the development of plants cultivated under salt stress. This work emphasizes the importance of mangroves for the search of bacteria with agriculture, industrial and biotechnological potential.

Key words: Mangrove, *Pseudomonas*, Global response regulator *gacA*, DGGE, Clone library, Biofertilizers, Salt stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BC1 – Ponto 1 do manguezal de Bertioga Contaminado

BC2 – Pontos 2 e 3 do manguezal de Bertioga Contaminado

CAN – Manguezal de Cananéia

CCA – Análise de Correspondência Canônica

C.E – Condutividade elétrica

CTC - Capacidade de troca catiônica

DGGE – Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

DNA - Ácido desoxirribonucleico

FAME - *Fatty Acid Methyl Ester*

Gac – Controle de antibióticos e cianeto global (*Global antibiotic and cyanide control*)

HPAs – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

IS – Irrigação salina

KB - King B

NCB – Manguezal de Bertioga não contaminado

PBS - *Phosphate buffered saline* - tampão fosfato

PCA – Análise de componentes principais

PCR - *Polymerase Chain Reaction* - reação em cadeia da polimerase

RDA – Análise de redundância

RNA – Ácido ribonucleico

RPCP - Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas

Rsm - Regulador do metabolismo secundário

SS – Solo salinizado

SSIS- Solo salinizado e irrigado com solução salina

sRNAs- Pequenos RNAs regulatórios não codificantes

UFC - Unidades formadoras de colônia

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Árvore filogenética (não enraizada) de 107 linhagens tipo de *Pseudomonas* baseada em análises filogenéticas de sequências parciais dos genes de 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* e *rpoD*. ----- 28
- Figura 2** - Metabólitos produzidos por *Pseudomonas* sp. com atividade antimicrobiana ---- 32
- Figura 3** - Modelos do sistema Gac / Rsm em *P. fluorescens* (a) e *P. aeruginosa* (b). A transcrição dos genes sRNA *rsm* (X) YZ é ativado por um regulador GACA de resposta, controlado por um sistema composto por quinases sensoriais (RETS e LADS). A RSM (X) YZ sRNAs inibe a função de proteína(s) de ligação-RNA proteína (s) RSMA (e RSME). A expressão do sRNAs está sob o controle de elementos adicionais regulatórios. Seta para baixo, controle positivo; linhas perpendiculares, controle negativo; linhas tracejadas, controle indireto----- 35
- Figura 4** - Mapa do estado de São Paulo----- 41
- Figura 5** - Esquema dos pontos de amostragem de sedimentos de manguezais estudados----- 41
- Figura 6** - Resultado da análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular da linhagem 73----- 58
- Figura 7** - Diversidade de *Pseudomonas* spp. isoladas de sedimentos de manguezais do estado de São Paulo. À direita, o gráfico representa os três manguezais. O tamanho dos gráficos está relacionado ao número total de isolados obtidos em cada manguezal amostrado----- 58
- Figura 8** - Teste de antibiose de extratos brutos de linhagens de *Pseudomonas* sp. contra o fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (Rs). Ao centro, o controle do fitopatógeno----- 60
- Figura 9** - Teste de concentração mínima inibitória do extrato bruto básico da linhagem 30 (*Pseudomonas* sp.) contra bactérias patogênicas: A) *Enterococcus* sp., B) *P. aeruginosa*, C) *Escherichia coli*, D) *Klebsiella pneumoniae*, E) *Burkholderia* sp. e F) *Staphylococcus aureus*. Concentração do extrato bruto: 1) 1,09 mg.mL⁻¹, 2) 0,55mg.mL⁻¹, 3) 0,28 mg.mL⁻¹ e 4) 0,14 mg.mL⁻¹ concentração mínima inibitória ----- 61
- Figura 10** - Perfil de DGGE para *Pseudomonas* spp., baseado no gene 16S rRNA, nas diferentes amostras de sedimentos avaliadas ----- 63
- Figura 11** - Perfil de DGGE para *Pseudomonas* spp., baseado no gene *gacA*, nas diferentes amostras de sedimentos avaliadas ----- 63
- Figura 12** - Análise de redundância (RDA) dos perfis do DGGE de *Pseudomonas* sp baseado no gene 16S rRNA. Os valores nos eixos indicam a porcentagem de variância total dos dados representada pelo eixo----- 64
- Figura 13** - Análise de correspondência canônica (CCA) dos perfis do DGGE de *pseudomonas* sp. baseado no gene *gacA*. Os valores nos eixos indicam a porcentagem de variância total dos dados representada pelo eixo ----- 64
- Figura 14** - Diversidade de *Pseudomonas* spp. em biblioteca de clones (16S rRNA) obtidos de sedimentos de manguezais. As siglas representam os manguezais

amostrados de Bertioga não contaminado (NCB), Bertioga contaminado com óleo cru ponto 1 (BC1), Bertioga contaminado com óleo cru pontos 2 e 3 (BC2) e Cananéia (CAN) 67

Figura 15 - Análise de agrupamento das UTOs das bibliotecas de clones do gene 16S rRNA de *Pseudomonas* spp. de sedimentos de manguezais. Para a análise foi utilizado o índice Jclass, com 0,03 de distância ----- 68

Figura 16 - Heatmap das bibliotecas de clones do gene 16S rRNA de *Pseudomonas* em sedimentos de manguezais do Estado de São Paulo ----- 68

Figura 17 - Diagrama de Venn baseado nas sequências de clones dos manguezais analisados. As siglas representam os manguezais amostrados de Bertioga não contaminado (NCB), Bertioga contaminado com óleo cru ponto 1 (BC1), Bertioga contaminado com óleo cru pontos 2 e 3 (BC2) e Cananéia (CAN) ----- 69

Figura 18 - Crescimento dos isolados avaliado nas diferentes concentrações de NaCl adicionado ao meio de cultivo ----- 87

Figura 19 - Diferentes níveis de produção de AIA por *Pseudomonas* sp. de sedimentos de manguezais ----- 88

Figura 20 - Produção de ácido indol acético por linhagens de *Pseudomonas* spp. ----- 89

Figura 21 - Fixação de nitrogênio por *P. plecoglossicida* (linhagem 24), à direita. À esquerda o controle negativo ----- 89

Figura 22 - Solubilização de fosfato por linhagens de *Pseudomonas* spp. ----- 90

Figura 23 - Quantificação de fosfato solúvel produzido por linhagens de *Pseudomonas* spp. ----- 90

Figura 24 - Produção de amônia por linhagens de *Pseudomonas* spp. de sedimento de manguezal ----- 92

Figura 25 - Produção de cianeto de hidrogênio por linhagens de *Pseudomonas* spp. ----- 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Pseudomonas</i> reconhecidas -----	27
Tabela 2 - Localização geográfica dos manguezais amostrados no estado de São Paulo -	40
Tabela 3 - Características físico-químicas de amostras de sedimentos de manguezais utilizadas neste estudo-----	42
Tabela 4 – Caracterização molecular e FAMES de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas de manguezais do Estado de São Paulo-----	56
Tabela 5 - Análise de difusão em ágar dos extratos brutos de <i>Pseudomonas</i> sp. contra fitopatógenos-----	59
Tabela 6 - Concentração Mínima Inibitória dos extratos brutos em pH ácido (A) e básico (B) de <i>Pseudomonas</i> spp. contra bactérias patogênicas-----	61
Tabela 7 - Análise enzimática de linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp-----	62
Tabela 8 - Quantificação da influência das variáveis ambientais (localização inter e intra-manguezais, parâmetros físico-químicos) sobre a composição das comunidades de <i>Pseudomonas</i> , com base nos genes de 16S rRNA e <i>gacA</i> . Os valores indicam a porcentagem de variância total causada independentemente por cada fator. Variáveis significativas estatisticamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de permutação de MonteCarlo, estão em negrito e indicadas com*-----	65
Tabela 9 - Caracterização química do solo-----	85
Tabela 10 - Potencial de linhagens de <i>Pseudomonas</i> para uso como biofertilizantes-----	91
Tabela 11. Avaliação de promoção de crescimento de milho (parâmetros: comprimento da parte aérea e da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz e área foliar) por linhagens de <i>Pseudomonas</i> sp. (24, 30, 103 e 109) e <i>Bacillus</i> sp. (39) de manguezais. Valores significativos estatisticamente, de acordo com o teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade, estão em negrito e indicados com ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ -----	93
Tabela 12 - Avaliação do desenvolvimento de milho (parâmetros: comprimento da parte aérea e da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz e área foliar) cultivado com irrigação salina e tratado com linhagens de <i>Pseudomonas</i> sp. (24, 30, 103 e 109) e <i>Bacillus</i> sp. (39) de manguezais. Valores significativos estatisticamente, de acordo com o teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade, estão em negrito e indicados com ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ -----	94
Tabela 13 - Avaliação do desenvolvimento de milho (parâmetros: comprimento da parte aérea e da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz e área foliar) cultivado em solo salinizado (SS) e tratado com linhagens de <i>Pseudomonas</i> sp. (24, 30, 103 e 109) e <i>Bacillus</i> sp. (39) de manguezais. Valores significativos estatisticamente, de acordo com o teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade, estão em negrito e indicados com ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ -----	94
Tabela 14 - Avaliação do desenvolvimento de milho (parâmetros: comprimento da parte aérea e da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz e área foliar) cultivado em solo	

salinizado e irrigado com solução salina (SSIS), tratado com linhagens de *Pseudomonas* sp. (24, 30, 103 e 109) e *Bacillus* sp. (39) de manguezais. Valores significativos estatisticamente, de acordo com o teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade, estão em negrito e indicados com ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ ----- 95

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – APRESENTAÇÃO DA PESQUISA E CONTEXTO TEÓRICO	19
1.1 INTRODUÇÃO	19
1.2 OBJETIVOS	21
1.3 REVISÃO DE LITERATURA	22
1.3.1 O ecossistema de manguezal	22
1.3.2 Diversidade e potencial biotecnológico de micro-organismos de manguezais	23
1.3.3 O gênero <i>Pseudomonas</i> spp.	26
1.3.3.1 Características taxonômicas	26
1.3.3.2 Importância agrícola, ambiental e biotecnológica	29
1.3.3.3 Compostos bioativos produzidos por <i>Pseudomonas</i> spp.	31
1.3.3.4 Regulador global de resposta <i>gacA</i> em <i>Pseudomonas</i> spp.	33
1.3.4 Técnicas moleculares para estudo de comunidades microbianas	35
1.3.4.1 Construção e análise de biblioteca de clones	36
1.3.4.2 Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante (DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)	37
CAPÍTULO 2 - DIVERSIDADE DE <i>Pseudomonas</i> spp. DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS E DETECÇÃO DO GENE <i>gacA</i>	39
2.1 INTRODUÇÃO	39
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	40
2.2.1 Caracterização da área de estudo e amostragem	40
2.2.2 Triagem de <i>Pseudomonas</i> spp. cultiváveis produtoras de compostos bioativos	42
2.2.2.1 Isolamento de <i>Pseudomonas</i> sp. cultiváveis de sedimentos de manguezais	43
2.2.2.2 Extração de DNA genômico de culturas puras de bactérias	43
2.2.2.3 Amplificação do gene <i>gacA</i> em linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp.	44
2.2.2.4 Amplificação do gene 16S RNAr de <i>Pseudomonas</i> spp.	44
2.2.2.5 Análise das sequências	45
2.2.2.6 Identificação de linhagens de <i>Pseudomonas</i> pela extração de ácidos graxos da membrana celular (FAME)	45
2.2.2.7 Análise dos extratos orgânicos das bactérias selecionadas	46
2.2.2.7.1 Obtenção de extratos orgânicos	46
2.2.2.7.2 Avaliação da atividade biológica de extratos brutos de <i>Pseudomonas</i>	47
2.2.2.7.2.1 Teste de antibiose de linhagens de <i>Pseudomonas</i> sp. contra fitopatógenos	47
2.2.2.7.2.2 Teste de Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos extratos brutos de <i>Pseudomonas</i> spp. contra bactérias patogênicas	47

2.2.3 Atividade enzimática de linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp.	48
2.2.3.1 Atividade amilolítica	48
2.2.3.2 Atividade celulolítica	48
2.2.3.3 Atividade de fenoloxidasas – lacase	49
2.2.3.4 Atividade lipolítica.....	49
2.2.3.5 Teste da catalase	49
2.2.4 DGGE (Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante)	49
2.2.4.1 Extração de DNA genômico de sedimento	50
2.2.4.2 Amplificação do gene 16S rRNA de <i>Pseudomonas</i> para DGGE.....	50
2.2.4.3 Amplificação do gene <i>gacA</i> para DGGE.....	50
2.2.4.4 Análise estatística do DGGE.....	51
2.2.5 Construção de biblioteca de clones 16S rRNA de <i>Pseudomonas</i>	52
2.2.5.1 Sequenciamento da biblioteca genômica de amostras de sedimentos de manguezais.....	53
2.2.5.2 Análise das sequências e definições de UTOs.....	53
2.3 RESULTADOS.....	54
2.3.1 Isolamento, detecção do gene <i>gacA</i> e diversidade de <i>Pseudomonas</i> spp.	54
2.3.2 Atividade antimicrobiana de extratos brutos de linhagens de <i>Pseudomonas</i> ---	59
2.3.3 Análise enzimática de linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp.	61
2.3.4 Estudo da estrutura da comunidade de <i>Pseudomonas</i> spp. em manguezais por DGGE	62
2.3.5 Biblioteca de clones 16S rRNA de <i>Pseudomonas</i> spp. de sedimentos de manguezais.....	66
2.4 DISCUSSÃO	70
CAPITULO 3 - POTENCIAL DE <i>Pseudomonas</i> spp. DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS PARA USO COMO BIOFERTILIZANTES EM SOLOS SALINOS	81
3.1 INTRODUÇÃO.....	81
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	82
3.2.1 Isolamento de <i>Pseudomonas</i> sp. de sedimento de manguezal	82
3.2.2 Caracterização fisiológica de tolerância à salinidade	82
3.2.3 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial de linhagens de <i>Pseudomonas</i> para uso como biofertilizantes.....	83
3.2.3.1 Produção da enzima aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase	83
3.2.3.2 Produção de ácido indol acético (AIA).....	83
3.2.3.3 Fixação de nitrogênio	83
3.2.3.4 Determinação qualitativa e quantitativa da solubilização de fosfato	84
3.2.3.5 Produção de amônia (NH ₃).....	84

3.2.3.6 Produção de cianeto de hidrogênio (HCN)	85
3.2.4 Avaliação do potencial de linhagens de <i>Pseudomonas</i> sp. para promoção de crescimento e proteção de milho (<i>Zea mays</i> L.) contra estresse salino	85
3.2.4.1 Preparo do solo	85
3.2.4.2 Preparo das suspensões bacterianas	86
3.2.4.3 Ensaio em casa-de-vegetação	86
3.3 RESULTADOS	87
3.3.1 Tolerância à salinidade	87
3.3.2 Produção de enzimas e hormônios promotores de crescimento de plantas	88
3.3.2.1 ACC deaminase	88
3.3.2.2 Produção de ácido 3-indol acético (AIA)	88
3.3.3 Mobilização de nutrientes	89
3.3.3.1 Fixação de nitrogênio	89
3.3.3.2 Detecção e quantificação da solubilização de fosfato inorgânico	90
3.3.4 Produção de amônia (NH₃)	91
3.3.5 Produção de cianeto de hidrogênio (HCN)	92
3.3.6 Avaliação do potencial de linhagens de <i>Pseudomonas</i> sp. para promoção de crescimento e proteção de milho (<i>Zea mays</i> L.) contra estresse salino	92
3.4 DISCUSSÃO	95
CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS	103
ANEXO	125
ANEXO A – Caracterização de sequências de clones obtidas de sedimentos de manguezais do Estado de São Paulo	126

CAPÍTULO 1 - APRESENTAÇÃO DA PESQUISA E CONTEXTO TEÓRICO

1.1 INTRODUÇÃO

O ecossistema de manguezal possui condições ambientais únicas, incluindo a interface de aerobiose e anaerobiose causada pelo regime de marés e a salinidade do solo que se situa entre 5 à 30%, podendo atingir até 90%. Os manguezais apresentam uma composição faunística e florística características, assim como uma microbiota adaptada as condições impostas pelo ambiente de transição de águas doces e salgadas.

Neste ambiente, os micro-organismos de sedimentos são abundantes e desempenham um importante papel na decomposição e mineralização da matéria orgânica, contribuindo para a produtividade do ecossistema de manguezal (NEDWELL et al., 1994; ALONGI, 1996; HOLGUIN et al. 2001) e ainda degradação de poluentes, em áreas impactadas. Além da importância ecológica e ambiental, os micro-organismos de manguezais podem ser importantes alvos biotecnológicos para a descoberta de produtos naturais.

Ambientes extremos, como os manguezais, são propícios para a bioprospecção de novos micro-organismos, suas atividades, produtos metabólicos ou genes. Os micro-organismos dos manguezais ainda são pouco estudados, apesar das particularidades desse ambiente. Muitos dos organismos de manguezais apresentam adaptações e especializações que lhes permitem sobreviver neste ambiente de águas salgadas. As comunidades bacterianas em ambientes salinos podem ser halofílicas ou halotolerantes (ZAHARAN et al., 1992), com diversa funcionalidade, como fixação de carbono, fixação de nitrogênio, degradação de celulose, metanogênese, produção de antibióticos e enzimas (HOLGUIN et al., 2001).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentam uma versatilidade metabólica e nutricional, com habilidade de se adaptar a diferentes ambientes, como os manguezais. As *Pseudomonas* são há muito tempo estudadas, no entanto, novas espécies e novos metabólitos produzidos por este grupo continuam sendo descritos. Na interação com espécies vegetais, *Pseudomonas* podem favorecer o desenvolvimento da planta conferindo maior resistência às condições de estresse (SGROY et al. 2009), fornecendo nutrientes como nitrogênio e fosfato solúvel e produzindo reguladores de crescimento vegetal. Dentre o potencial dessas bactérias

está à capacidade de promoção de crescimento de plantas, o controle biológico de fitopatógenos, a degradação de xenobióticos, a produção de biossurfactantes, a produção de enzimas e a produção de antibióticos.

Muitos dos antibióticos e enzimas produzidas por *Pseudomonas* sp. são regulados pelo gene *gacA*, assim este gene pode ser utilizado para bioprospecção neste grupo de bactérias. O uso de técnicas de biologia molecular para estudo de diversidade e *screening* funcional de comunidades microbianas pode permitir o acesso a novos micro-organismos, possibilitar a descoberta de novos produtos naturais, além de possibilitar o conhecimento da ecologia desses micro-organismos em seu ambiente natural.

Dessa forma, no presente estudo foram usados métodos dependentes e independentes de cultivo para avaliar a diversidade de comunidades de *Pseudomonas* de sedimentos de manguezais do Estado de São Paulo, utilizando o gene *gacA* para selecionar linhagens produtoras de antibióticos e enzimas. Adicionalmente, também foi avaliado o potencial de linhagens de *Pseudomonas* para promoção de crescimento de planta e tolerância a estresse salino.

1. 2 OBJETIVOS

Avaliar a diversidade e o potencial biotecnológico de *Pseudomonas* spp. presentes em sedimentos de manguezais. Os objetivos específicos são:

- Avaliar a diversidade de *Pseudomonas* spp. de sedimentos de manguezais do Estado de São Paulo, utilizando o gene *gacA* como alvo (regulador global de *gacA*) para seleção de linhagens e bioprospecção de compostos bioativos neste grupo;
- Avaliar o potencial de linhagens de *Pseudomonas* spp. para produção de compostos de interesse biotecnológico;
- Analisar a estrutura e composição da comunidade de *Pseudomonas* spp. de sedimentos de três diferentes manguezais do Estado de São Paulo por técnicas independentes de cultivo;
- Avaliar a capacidade de tolerância à salinidade de linhagens de *Pseudomonas* spp. e o potencial para promoção de crescimento de plantas de milho (*Zea mays*) sob estresse salino.

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 O ecossistema de manguezal

Os manguezais constituem um ecossistema de transição entre os ambientes terrestre, marinho e de água doce. Este ecossistema 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, a sua distribuição (cerca de 20.000 Km²) é uma das maiores do mundo em extensão, podendo ser encontrado desde o Cabo Orange, no Amapá, até o sul de Santa Catarina, na foz do Rio Araranguá, município de Laguna (CURY, 2002).

No Estado de São Paulo, na região da baixada santista, formada pelos municípios de Bertioga, Cubatão, Guarujá, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos e São Vicente (CURY, 2002) encontram-se uma das maiores concentrações de manguezais do estado, apresentando uma área de cobertura vegetal de 675 Km², da qual 125 Km² correspondem a áreas típicas de manguê (PRADA-GAMERO, 2001).

Os manguezais podem ser definidos como halofíticos, principalmente em relação às espécies vegetais que crescem em sob influência das marés ao longo das costas tropicais e subtropicais (DUKE, 1998). No Brasil, a vegetação dos manguezais é representada pelos gêneros *Rhizophora*, *Laguncularia* e *Avicennia*. No gênero *Rhizophora* encontra-se o manguê vermelho, *R. mangle* (Família Rhizophoraceae). O manguê branco é representado pela *Laguncularia racemosa* (Família Combretaceae) e o manguê negro representado pelas espécies *Avicennia germinans* e *Avicennia shaueriana* (Família Verbenaceae) (PRADA-GAMERO, 2001; CURY, 2002).

O solo de manguezal é composto basicamente por matéria orgânica misturada com sedimento, sendo anaeróbio, exceto para os sedimentos de superfície (HOLGUIN et al., 2001). Comunidades bacterianas de sedimentos possuem um importante papel ecológico em ciclos biogeoquímicos em ecossistemas aquáticos. Isto resulta de sua alta abundância (> 10⁸ células por grama) (CAMMEN, 1982; MONTAGNA, 1982; DANOVARO et al., 2002) como também de sua função

chave em sistemas pela regulação da transformação de elementos biogênicos como C, N, P, Fe, O, e S (NELSON, 1997).

Ecossistemas de manguezais apresentam 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, reduzir o assoreamento dos portos e diminuir os impactos decorrentes da lixiviação de compostos químicos. Apesar de constituírem Área de Preservação Permanente (Lei 4771 de 15 de setembro de 1965 do código florestal), há sérias preocupações, tanto no que diz respeito à conservação quanto à recuperação desses ecossistemas de manguezais, os quais vêm sendo destruídos devido à expansão urbana, resíduos industriais, obras de engenharia, lixões, marinas, carcinicultura e aterros sanitários (BARAN; HAMBREY, 1998; SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2001). Os efeitos sobre o ambiente costeiro se dão através da erosão e sedimentação, eutrofização e mudanças nas cadeias alimentares e na estrutura de comunidades (LACERDA, 2003).

1.3.2 Diversidade e potencial biotecnológico de micro-organismos de manguezais

Dentre os ecossistemas terrestres, alguns chamam a atenção devido a particular combinação de condições ambientais únicas, que resultam na evolução de espécies capazes de colonizar restritamente este ambiente, assim como ocorre em manguezais, com vegetação característica, sedimento com condições específicas de salinidade e baixa disponibilidade de oxigênio.

Estudos recentes em manguezais do estado de São Paulo têm revelado um grande potencial agrícola e biotecnológico das bactérias presentes nesse ambiente. Inoculantes bacterianos, a base de *Bacillus* e de *Pseudomonas*, avaliados em condições de casa-de-vegetação, demonstram grande potencial de serem usados no controle da podridão radicular de pepino em culturas hidropônicas (CORRÊA, 2009).

Autores relatam o potencial de bactérias residentes de manguezais para fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de hormônios de crescimento vegetal (HOLGUIN et al., 1992; HOLGUIN et al., 1999; VAZQUEZ et al., 2000; ROJAS et al., 2001; RAVIKUMAR et al., 2002, GOTTARDO, 2009). A

habilidade de fixação de nitrogênio por bactérias isoladas da rizosfera de *Rhizophora mangle* e *Avicennia germinans*, classificadas como *Listonella anguillarum* e *Vibrio campbelli*, foi demonstrada por Holguin et al. (1992). Rojas et al. (2001) avaliaram as possíveis interações de duas potenciais bactérias promotoras de crescimento residentes de manguezais, uma fixadora de nitrogênio (*Phyllobacterium* sp.), outra solubilizadora de fosfato (*Bacillus licheniformis*), *in vitro*, em plântulas de mangue-negro. Os autores verificaram que, quando as bactérias foram cultivadas de forma conjunta, houve o aumento da fixação de nitrogênio e da solubilização de fosfato. Quando as mudas de mangue-negro foram tratadas com os isolados bacterianos e cultivadas em água do mar artificial, foi verificado maior desenvolvimento de folhas. Bashan et al. (1998) verificaram maiores quantidades de nitrogênio total e ^{15}N em mudas de mangue-negro, nos tratamentos onde as cianobactérias diazotróficas *Microcoleus chthonoplastes* (isolados B1 e SC7B9002-1) foram aplicadas, em condições *in vitro*, sem competição com outros isolados.

Zhang et al. (2008), utilizando técnicas independentes de cultivo, observaram uma biodiversidade de bactérias diazotróficas em sedimentos de manguezais da China, com predominância dos gêneros *Azotobacter*, *Desulfuromonas*, *Sphingomonas*, *Geobacter*, *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium* e *Derrxia*.

Sá (2008) relata o potencial para produção de enzimas endoglicolíticas por *Bacillus* sp. isolados da rizosfera de *Rhizophora mangle*. Estas linhagens também demonstraram capacidade de responder ao estresse salino pela formação de biofilme. Khandeparker et al. (2011) descobriram uma nova xilanase halotolerante produzida por uma linhagem de *Bacillus subtilis* cho40 isolada de manguezal. Os autores enfatizam a importância dessa enzima para produção de bioetanol a partir de algas marinhas por meio da otimização do processo.

De acordo com Das, Lyla e Khan (2006), o ecossistema manguezal é um importante reservatório de actinobactérias produtoras de antibióticos. Nos manguezais de Cananéia e Bertioga do estado de São Paulo, foi verificada a predominância da espécie *Streptomyces luridiscabiei*. Neste trabalho, foi verificado que 75% das actinobactérias são capazes de inibir o crescimento dos fitopatógenos *Pythium apnadidermatum* e *Phytophthora* sp. (CANOVA, 2009).

Novos gêneros de cianobactérias foram identificados em sedimentos de manguezais do estado de São Paulo como *Cyanthece*, *Chlorogloea* sp., *Leptolynbya*, *Microchaete* sp. Algumas destas cianobactérias, por sua vez, codificam

para o gene *nifH* (envolvido na fixação de nitrogênio) e todas amplificam o gene PKS (poliketídio sintase) envolvido em metabólitos com ação anticancerígena. Também, estudou-se a produção de microcistinas e saxitoxinas por essas cianobactérias (GENUÁRIO, 2010; SILVA, 2010). Em estudo da diversidade de cianobactérias da filosfera de três espécies vegetais (*R. mangle*, *L. racemosa* e *A. schaueriana*) foi observada predominância das ordens Nostocales e Oscillatoriales. Neste estudo foi demonstrada a influência das condições ambientais de manguezais brasileiros sobre cianobactérias da filosfera (RIGONATO et al., 2012).

Estudos recentes de comunidades de arqueias em sedimentos de manguezais do Estado de São Paulo demonstraram predominância do grupo Thaumarchaeota (53,1 %, 24 OTUs) entre as sequências analisadas e ainda sequências afiliadas ao grupo Euryarchaeota (29,6%) e a um grupo de Archeas não classificado (16,1%) (DIAS et al., 2011).

Os gêneros *Diaphorthe*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Colletotrichum* e *Xylaria* foram os mais frequentes dentre os 35 gêneros isolados e caracterizados de fungos endofíticos de plantas de manguezais do Estado de São Paulo. Dentre as linhagens produtoras de antibiótico, 29,41% pertencem ao gênero *Diaphorthe*, sendo este o mais frequente na comunidade fungica de manguezais. Este estudo selecionou a linhagem 41.1 (1) de *D. phaseolorum*, produtora de um antibiótico identificado como ácido 3-hidroxipropiônico, ativo contra os patógenos humanos *Staphylococcus aureus* e *Salmonella tiphy* (SEBASTIANES, 2010).

Em estudo de degradação de óleo cru foram isoladas bactérias de diferentes profundidades de sedimentos contaminados de Bertioga, altamente eficiente na produção de biossurfactantes. Algumas delas codificam para presença dos genes dioxigenases catecol 1,2-dioxigenase (cat) e protocatecol 3,4-dioxigenase (pro), enzimas chave no catabolismo de hidrocarbonetos (REYES, 2009). Em sedimento de manguezal de uma reserva natural de Hong Kong, foi isolada uma *Pseudomonas fluorescens* B-1 capaz de degradar n-Butyl benzil phthalato (BBP). Os autores deste estudo sugerem que o ambiente de manguezal possibilita a mineralização do BBP (XU et al., 2007).

1.3.3 O gênero *Pseudomonas* sp.

1.3.3.1 Características taxonômicas

Pseudomonas é o gênero incluído nas γ -proteobactérias, pertencente à família das *Pseudomonadaceae*. São bactérias Gram-negativas, quimiorganotróficas. Os membros do gênero *Pseudomonas* fazem parte de um grande e heterogêneo grupo, altamente versátil metabolicamente (WILLIS et al. 2001). As espécies de *Pseudomonas* sobrevivem em diversas condições ambientais, ocupando numerosos e diversos nichos ecológicos, podendo crescer sob condições úmidas no solo, em associação com plantas, em sedimentos de água de esgoto e ambientes aquáticos (MADIGAN et al. 1997; de SOUZA, 2002). Este gênero contém patógenos humanos, de plantas e animais, como também espécies de interesse ambiental, como bactérias promotoras de crescimento de plantas, degradadoras de xenobióticos e agentes de controle biológico (PALLERONI, 1992; JOHNSEN et al., 1996).

O gênero *Pseudomonas* Migula 1894 foi originalmente estabelecido baseado em características morfológicas e metabolismo celular. O reconhecimento de que se trata de um grupo bastante heterogêneo e as subseqüentes reorganizações taxonômicas, são resultados de muitos anos de estudos moleculares. O seqüenciamento do gene 16S rRNA gene (*rrs*) tem redistribuído algumas das espécies anteriormente identificadas como *Pseudomonas* em outros gêneros, em particular, nas subclasses alfa, beta ou gama Proteobacteria (KERSTERS et al., 1996).

Apesar de há muito tempo estudado, novas espécies ainda vêm sendo descritas para este gênero, tais como *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov., *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov. (KWON et al., 2003), *Pseudomonas reinekei* sp. nov., *Pseudomonas moorei* sp. nov. e *Pseudomonas mohnii* sp. nov. (CÁMARA et al., 2007). A taxonomia deste gênero é complexa, compreendendo 196 espécies reconhecidas (EUZÉBY, 2012, Tabela 1).

Mulet et al. (2012) analisou as seqüências dos genes 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD* e *rpoB*, para 107 linhagens tipo de *Pseudomonas*, compreendendo 3.726 nucleotídeos, mostrando inter-relações entre 18 grupos nomeados de acordo com a primeira espécie descrita de cada grupo (Figura 1).

Tabela 1 - Espécies de *Pseudomonas* reconhecidas

<i>P. abietaniphila</i>	<i>P. cissicola</i>	<i>P. huttiensis</i>	<i>P. nitroreducens</i>	<i>P. saccharophila</i>
<i>P. acidovorans</i>	<i>P. citronellolis</i>	<i>P. indica</i>	<i>P. oleovorans</i>	<i>P. salomonii</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. cocovenenans</i>	<i>P. indigofera</i>	<i>P. orientalis</i>	<i>P. savastanoi</i>
<i>P. agarici</i>	<i>P. composti</i>	<i>P. iners</i>	<i>P. oryzae</i>	<i>P. segetis</i>
<i>P. alcaligenes</i>	<i>P. congelans</i>	<i>P. japonica</i>	<i>P. otitidis</i>	<i>P. selenii</i>
<i>P. alcaliphila</i>	<i>P. corrugata</i>	<i>P. jessenii</i>	<i>P. pachastrellae</i>	<i>P. simiae</i>
<i>P. aminovorans</i>	<i>P. costantinii</i>	<i>P. jinjuensis</i>	<i>P. palleroniana</i>	<i>P. solanacearum</i>
<i>P. amygdali</i>	<i>P. cremoricolorata</i>	<i>P. kilonensis</i>	<i>P. palleronii</i>	<i>P. spinosa</i>
<i>P. andropogonis</i>	<i>P. cuatrecasasensis</i>	<i>P. knackmussii</i>	<i>P. panacis</i>	<i>P. stanieri</i>
<i>P. anguilliseptica</i>	<i>P. deceptionensis</i>	<i>P. koreensis</i>	<i>P. panipatensis</i>	<i>P. straminea</i>
<i>P. antarctica</i>	<i>P. delafieldii</i>	<i>P. lanceolata</i>	<i>P. parafulva</i>	<i>P. stutzeri</i>
<i>P. antimicrobica</i>	<i>P. delhiensis</i>	<i>P. lemoignei</i>	<i>P. paucimobilis</i>	<i>P. synxantha</i>
<i>P. argentinensis</i>	<i>P. diminuta</i>	<i>P. libanensis</i>	<i>P. pelagia</i>	<i>P. syringae</i>
<i>P. arsenicoxydans</i>	<i>P. doudoroffii</i>	<i>P. lini</i>	<i>P. peli</i>	<i>P. syzygii</i>
<i>P. asplenii</i>	<i>P. duriflava</i>	<i>P. lundensis</i>	<i>P. perfectamarina</i>	<i>P. taeanensis</i>
<i>P. aurantiaca</i>	<i>P. echinoides</i>	<i>P. lurida</i>	<i>P. pertucinogena</i>	<i>P. taeniospiralis</i>
<i>P. aureofaciens</i>	<i>P. elongata</i>	<i>P. lutea</i>	<i>P. phenazinium</i>	<i>P. taetrolensis</i>
<i>P. avellanae</i>	<i>P. extremaustralis</i>	<i>P. luteola</i>	<i>P. pickettii</i>	<i>P. taiwanensis</i>
<i>P. avenae</i>	<i>P. extremorientalis</i>	<i>P. mallei</i>	<i>P. pictorum</i>	<i>P. testosteroni</i>
<i>P. azotifigens</i>	<i>P. facilis</i>	<i>P. maltophilia</i>	<i>P. plantarii</i>	<i>P. thermotolerans</i>
<i>P. azotoformans</i>	<i>P. ficuserectae</i>	<i>P. mandelii</i>	<i>P. plecoglossicida</i>	<i>P. thivervalensis</i>
<i>P. balearica</i>	<i>P. flava</i>	<i>P. marginalis</i>	<i>P. poae</i>	<i>P. tolaasii</i>
<i>P. bauzanensis</i>	<i>P. flavescens</i>	<i>P. marina</i>	<i>P. pohangensis</i>	<i>P. toyotomiensis</i>
<i>P. beijerinckii</i>	<i>P. flectens</i>	<i>P. marincola</i>	<i>P. proteolytica</i>	<i>P. tremae</i>
<i>P. beteli</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. mediterranea</i>	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	<i>P. trivialis</i>
<i>P. borboni</i>	<i>P. fragi</i>	<i>P. meliae</i>	<i>P. pseudoflava</i>	<i>P. tuomuerensis</i>
<i>P. boreopolis</i>	<i>P. frederiksbergensis</i>	<i>P. mendocina</i>	<i>P. pseudomallei</i>	<i>P. umsongensis</i>
<i>P. brassicae</i>	<i>P. fulva</i>	<i>P. mephitica</i>	<i>P. psychrophila</i>	<i>P. vancouverensis</i>
<i>P. brenneri</i>	<i>P. fuscovaginae</i>	<i>P. meridiana</i>	<i>P. psychrotolerans</i>	<i>P. veronii</i>
<i>P. caeni</i>	<i>P. gelidicola</i>	<i>P. mesophilica</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. vesicularis</i>
<i>P. cannabina</i>	<i>P. geniculata</i>	<i>P. migulae</i>	<i>P. pyrocinia</i>	<i>P. viridiflava</i>
<i>P. carboxydohydrogena</i>	<i>P. gessardii</i>	<i>P. mixta</i>	<i>P. radiora</i>	<i>P. vranovensis</i>
<i>P. caricapapayae</i>	<i>P. gladioli</i>	<i>P. mohnii</i>	<i>P. reinekei</i>	<i>P. woodsii</i>
<i>P. caryophylli</i>	<i>P. glathei</i>	<i>P. montellii</i>	<i>P. resinovorans</i>	<i>P. xanthomarina</i>
<i>P. cattleyae</i>	<i>P. glumae</i>	<i>P. moorei</i>	<i>P. rhizosphaerae</i>	<i>P. xiamenensis</i>
<i>P. cedrina</i>	<i>P. graminis</i>	<i>P. moraviensis</i>	<i>P. rhodesiae</i>	<i>P. xinjiangensis</i>
<i>P. cepacia</i>	<i>P. grimmii</i>	<i>P. mosselii</i>	<i>P. rhodos</i>	
<i>P. chloritidis</i>	<i>P. guineae</i>	<i>P. mucidolens</i>	<i>P. rubrilineans</i>	
<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. halophila</i>	<i>P. multiresistivora</i>	<i>P. rubrisubalbicans</i>	
<i>P. cichorii</i>	<i>P. hibiscicola</i>	<i>P. nautica</i>	<i>P. sabulini</i>	

Dados de Euzéby (2012).

Figura 1 - Árvore filogenética (não enraizada) de 107 linhagens tipo de *Pseudomonas* baseada em análises filogenéticas de sequências parciais dos genes de 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* e *rpoD*.

A barra indica divergência de sequência. A matriz de distância foi calculada pelo método Jukes-Cantor. Dendograma foi gerado por *neighbour-joining*. *Cellvibrio japonicus* Ueda107 foi usado como *outgroup*. (1) *P. antarctica*^T, (2) *P. azotoformans*^T, (3) *P. cedrina*^T, (4) *P. costantini*^T, (5) *P. extremorientalis*^T, (6) *P. fluorescens*^T, (7) *P. grimontii*^T, (8) *P. libaniensis*^T, (9) *P. marginalis*^T, (10) *P. orientalis*^T, (11) *P. palleroniana*^T, (12) *P. panacis*^T, (13) *P. poae*^T, (14) *P. salomonii*^T, (15) *P. synxantha*^T, (16) *P. tolaasi*^T, (17) *P. trivialis*^T, (18) *P. veronii*^T, (19) *P. rhodesiae*^T, (20) *P. simiae*^T, (21) *P. brenneri*^T, (22) *P. gessardi*^T, (23) *P. meridiana*^T, (24) *P. mucidolens*^T, (25) *P. proteolytica*^T, (26) *P. brassicacearum*^T, (27) *P. corrugata*^T, (28) *P. kilonensis*^T, (29) *P. mediterranea*^T, (30) *P. thivervalensis*^T, (31) *P. agarici*^T, (32) *P. asplenii*^T, (33) *P. fuscovaginae*^T, (34) *P. aurantiaca*^T, (35) *P. aureofaciens*^T, (36) *P. chlororaphis*^T, (37) *P. koreensis*^T, (38) *P. moraviensis*^T, (39) *P. jessenii*^T, (40) *P. vancouverensis*^T, (41) *P. umsongensis*^T, (42) *P. mohnii*^T, (43) *P. moorei*^T, (44) *P. reinekei*^T, (45) *P. frederiksbergensis*^T, (46) *P. mandelii*^T, (47) *P. lini*^T, (48) *P. migulae*^T, (49) *P. fragi*^T, (50) *P. lundensis*^T, (51) *P. psychrophyla*^T, (52) *P. taetrolens*^T, (53) *P. amygdali*^T, (54) *P. avellanaea*^T, (55) *P. cannabina*^T, (56) *P. caricapapayae*^T, (57) *P. cichorii*^T, (58) *P. congelans*^T, (59) *P. ficuserectae*^T, (60) *P. meliae*^T, (61) *P. savastanoi*^T, (62) *P. syringae*^T, (63) *P. tremiae*^T, (64) *P. viridiflava*^T, (65) *P. abietaniphila*^T, (66) *P. graminis*^T, (67) *P. lutea*^T, (69) *P. cremoricolorata*^T, (70) *P. fulva*^T, (71) *P. mosselii*^T, (72) *P. montelii*^T, (73) *P. parafulva*^T, (74) *P. plecoglossicida*^T, (75) *P. putida*^T, (76) *P. aeruginosa*^T, (77) *P. citronellolis*^T, (78) *P. jinjuensis*^T, (79) *P. nitroreducens*

(80) *P. panipatensis*T, (81) *P. knackmussii*T, (82) *P. resinovorans*T, (83) *P. otitidis*T, (84) *P. indica*T, (85) *P. thermotolerans*T, (86) *P. alcaligenes*T, (87) *P. oryzihabitans*T, (88) *P. psychrotolerans*T, (89) *P. alcaliphila*T, (90) *P. mendocina*T, (91) *P. oleovorans*T, (92) *P. pseudoalcaligenes*T, (93) *P. argentinensis*T, (94) *P. flavescens*T, (95) *P. straminea*T, (96) *P. anguilliseptica*T, (97) *P. peli*T, (98) *P. guineae*T, (99) *P. marincola*T, (100) *P. borbori*T, (101) *P. azotifigens*T, (102) *P. balearica*T, (103) *P. stutzeri*T, (104) *P. xanthomarina*T. Fonte: Mulet et al., 2010.

1.3.3.2 Importância agrícola, ambiental e biotecnológica

A maioria das espécies de *Pseudomonas* spp. são habitantes saprofíticas de água, solos e ambientes relacionados, com grande interesse para aplicações biotecnológicas. Dentre o gênero das *Pseudomonas*, o maior número das espécies refere-se ao grupo das fluorescentes. *Pseudomonas* spp. fluorescentes estão envolvidas na conservação do ambiente. Seus metabolismos de carbono e energia são responsáveis pela dissimilação de nitrato e degradação de compostos xenobióticos. A diversidade metabólica das *Pseudomonas* spp. fluorescentes, dá à estas bactérias uma grande habilidade para adaptação a vários ambientes (LATOURET; LEMANCEAU, 1997).

A natureza predominante de *Pseudomonas* fluorescentes na rizosfera de plantas como o algodão (HOWELL; STIPANOVIC, 1980), tomate (CLAYS-JOSSERAND et al. 1999), arroz, banana (VLASSAK et al., 1992; SUTRA et al., 2000), trigo (SANDS; ROVIRA, 1971), canola (MISKO; GERMIDA, 2002) e batata (LOTTMANN; BERG, 2001), tem sido relatada. A variabilidade genética e a caracterização funcional dessas bactérias com potencial antagônico, progressivamente vem sendo explorada.

O interesse em *Pseudomonas* fluorescentes para controle biológico e produção de sideróforos tem aumentado pelo fato de reduzirem a população rizosférica de bactérias e fungos fitopatogênicos (HAAS; DÉFAGO, 2005; WELLER, 2007; VILLEGAS et al., 2002). O controle biológico pela introdução ou pelo manejo de *Pseudomonas* do grupo fluorescente nos locais de colonização do patógeno pode proporcionar a eliminação da microbiota deletéria, ação de antibiose a vários patógenos, produção de sideróforos (MAVRODI et al., 2006; MOSSIALOS; AMOUTZIAS, 2007; MOON et al., 2008), produção de fitohormônios (LEVEAU; GERARDS, 2008), capacidade de colonização extensiva da rizosfera, e além disso, incitar um aumento no desenvolvimento e na produção da planta (DE WEGER et al., 1995; PEIXOTO, et al., 1995; WILLIS et al. 2001; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001; TAGHAVI et al., 2009). O gênero *Pseudomonas*, está entre os vários micro-organismos fixadores de nitrogênio em plantas, sendo capazes também de solubilizar fosfato (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; KAMPFER, 2007; NAIK et al., 2008), possuindo alto potencial agrícola e biotecnológico (PERIN et al., 2006).

Alguns membros do gênero *Pseudomonas* podem causar doenças em plantas e em humanos (von GRAEVENITZ; WEINSTEIN, 1971; GOULD et al., 1985). Em plantas, *Pseudomonas* são eficientes colonizadoras e formam íntima associação com a célula hospedeira, causando doença ou promovendo o crescimento e resistência sistêmica à doença (BAKKER et al., 2007; RAMOS-SOLANO et al., 2008). Essas bactérias são invasoras oportunistas e causam doenças como a mancha areolada em plantas de feijão, o amarelecimento em palmas, induzindo a podridão mole no tecido da planta (WILLIS et al. 2001). Duas interações entre *Pseudomonas* e plantas atraem significativa atenção: o parasitismo da planta pela espécie patogênica *P. syringae* (ALFANO; COLMER, 1997) e a estimulação do crescimento da planta e indução de resistência sistêmica (IRS) por *P. putida* e *P. fluorescens*, promotoras do crescimento de plantas (van LOON et al., 1998; PIETERSE; van LOON, 1999).

Pseudomonas também podem desempenhar importante papel ambiental, como a degradação de poluentes orgânicos, como o bisfenol A, pela produção de enzimas como a lacase, que também apresenta inúmeras aplicações biotecnológicas (TELKE et al., 2009). Espécies de *Pseudomonas* sp. têm demonstrado extraordinária habilidade na degradação de compostos específicos como: clorofenol, hidrocarbonetos aromáticos, nitroaromáticos, propanil (DUA et al., 2003; ESPÓSITO, AZEVEDO, 2004; KARIGAR, 2006). Devido a esse potencial para degradação de poluentes orgânicos, algumas espécies vêm sendo usadas na biorremediação de águas e solos (CHOUDHARY; SAR, 2009; YOSHIDA et al., 2009). Algumas espécies têm sido usadas em novos campos biotecnológicos como desenho de biosensores (KUMAR et al., 2008; PHAM et al., 2008; ODACI et al., 2009).

Pseudomonas tem uma enorme capacidade para sintetizar numerosas moléculas, incluindo enzimas, piocianinas, homo-serina lactonas, exopolissacarídeos (alginatos), compostos de superfície-ativos (ramnolipídeos, viscosina), polímeros intracelulares (polihidroxialcanoatos – PHAs). Ramnolipídeos e PHAs de espécies de *Pseudomonas* possuem um vasto potencial de aplicação industrial. Ramnolipídeos geralmente são produzidos por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*. Suas propriedades originais, incluindo a detergência, a formação de espuma, a emulsão, ação desumificante, solubilizante, umidificante, espessante, imobilizador de metais, formação de vesículas e dispersão de fase,

fazem dessas moléculas apropriadas para o uso em fármacos, em cosméticos e em alimentos (NITSCHKE et al., 2011).

1.3.3.3 Compostos bioativos produzidos por *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas fluorescentes são conhecidas por produzir uma gama de metabólitos secundários, alguns deles com atividade antimicrobiana (Figura 1), como antibióticos e HCN (ZAGO et al., 2000; HAAS; DÉFAGO, 2005). Essas bactérias secretam sideróforos fluorescentes verde-amarelos denominados pioverdinas ou pseudobactinas (LAMONT et al., 2003), responsáveis pela fluorescência observada em luz ultra-violeta. As pioverdinas podem sob certas condições, contribuir para a supressão de patógenos de solo (KLOEPPER et al., 1980; LOPER, BAYER, 1991). Fedrizi (2006) isolou uma linhagem de *P. putida* TP16 da Terra preta antropogênica, produtora de sideróforos da classe catecol e hidroxamato, identificando o composto pseudomonina com atividade antimicrobiana.

Antibióticos produzidos por *Pseudomonas* fluorescentes desempenham papéis fundamentais na supressão de patógenos de solo. O 2,4 Diacetilfluoroglucinol (DAPG) tem ação sobre inúmeros patógenos de plantas, incluindo bactérias, fungos e nematóides (RAAIJMAKERS et al., 2001). O DAPG também tem recebido atenção na área médica, devido à atividade bacteriocida deste antibiótico contra *Staphylococcus aureus* resistente a múltiplas drogas (ISNANSETYO et al., 2003). Num recente estudo, é descrita uma nova linhagem de *Pseudomonas putida*, isolada de esponja, que produz uma poderosa substância antimicrobiana contra bactérias resistentes a multidrogas (MARINHO et al., 2009).

A pirrolnitrina produzida por algumas espécies de *Pseudomonas*, tem atividade contra várias bactérias e fungos patogênicos de solo, em particular contra *Rhizoctonia solani* (ARIMA et al., 1969), sendo também efetiva contra doenças pós-colheita causadas por *Botrytis cinerea* em flores (HAMMER; EVENSEN, 1993) e usada para tratamento de infecções humanas contra fungos oportunistas (TAWARA et al., 1989). A pioluterina é um policetídeo fenólico com atividades bactericida, herbicida, fungicida e oomicida, especialmente contra *Pythium* sp. (TAKEDA et al., 1958; MAURHOFFER et al., 1992).

As fenazinas incluem mais de 80 produtos naturais contendo nitrogênio heterocíclicos, sintetizadas por *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Muitos são pigmentos que exibem atividade antibiótica de amplo espectro contra bactérias, fungos e parasitas, apresentando também atividade antitumoral (LAURSEN; NIELSEN, 2004).

Figura 2 - Metabólitos produzidos por *Pseudomonas* sp. com atividade antimicrobiana.

Fonte: Hass e Keel, 2003.

A viscosinamida é um dos lipopeptídeo cíclicos produzidos por *Pseudomonas* sp. com propriedades surfactante e antibiótica (NIELSEN et al., 1999). Recentemente, lipopeptídeos de *Pseudomonas* tem sido classificados em seis grupos: viscosina, siríngomicina, amfisina, putisolvina, tolaasina e siríngopeptina (GROSS; LOPER, 2009). Mendes et al. (2011) demonstraram que membros das Pseudomonaceae protegem as plantas de infecções fúngicas pela produção de um lipopeptídeo clorado codificado por genes de peptídeo não ribossomal (NRPS).

Com poucas exceções (PRESTON et al., 2001), linhagens de *Pseudomonas* spp., efetivas para o biocontrole, produzem antibióticos voláteis que inibem micro-organismos patogênicos *in vitro* (THOMASHOW et al., 1988; HASS et al., 2003).

1.3.3.4 Regulador global de resposta *gacA* em *Pseudomonas* spp.

As interações entre micro-organismos mediadas por espécies de *Pseudomonas* são os maiores direcionadores de controle biológico de fungos fitopatogênicos na rizosfera e beneficiam indiretamente o crescimento e a sanidade das plantas (COSTA et al., 2007). O gene regulador global de resposta *gacA* (para antibióticos e cianeto globais; LAVILLE et al., 1992) é requerido para a produção de muitos metabólitos secundários e exoenzimas tanto em *Pseudomonas* benéficas às plantas, quanto nas espécies patogênicas (SACHERER et al., 1994; HEEB; HAAS, 2001).

A síntese de moléculas envolvidas em interações antagonistas e supressão de doenças como os antibióticos 2,4 diacetilfloroglucinol e pioluterina, biocidas como o HCN, o autoindutor N-butilil-homoserina lactona, o pigmento azul fenazina e a enzima lítica lipase, são positivamente controlados pelo *gacA* (PIERSON et al., 1996; REIMMANN et al., 1997; BLUMER et al., 1999; DUFFY; DÉFAGO, 2000; HAAS; KEEL, 2003; SONNLEITNER; HASS, 2011; Figura 3). Muitos desses compostos também desempenham importante papel na resistência a estresse, sucesso ecológico e competência rizosférica (MAZZOLA et al., 1992; WHISTLER et al., 1998; BULL et al., 2001).

Jousset et al. (2006) relatam que a produção de antibióticos regulada pelo *gacA* de *Pseudomonas* tem um significativo papel na defesa bacteriana contra protozoários predadores. Em estudos com mutantes para o sistema GacS/GacA foi demonstrado que a produção de sideróforos e compostos com ação antibacteriana a *Ralstonia solanaraceum* e *Clavibacter michiganenses* spp. não são controlados por estes genes (ALIT-SUSANTA; TAKIKAWA, 2006).

Modificações nos genes *gacA* e *gacS* induzem variações fenotípicas em *Pseudomonas* spp. (van den BROEK et al., 2005) não apenas pela regulação de antibióticos e exoenzimas, como também pela formação de biofilme, motilidade, atividade biossurfactante (DRENKARD; AUSUBEL, 2002; van den BROEK et al., 2003) e a capacidade de virulência de espécies patogênicas (MARUTANI et al., 2008).

Estudos com linhagens de *Pseudomonas* spp. tem permitido elucidar o mecanismo de indução de antibiose pelo GacA. Autores descrevem um sistema bacteriano de dois componentes de transdução de sinais, que consiste na quinase

sensorial GacS da membrana e num regulador de resposta transcricional citoplasmático GacA, respondem aos sinais que acumulam durante o crescimento e controlam positivamente a expressão de pequenos RNA(s) reguladores (Figura 3), para o controle da expressão de determinados genes (HEEB; HAAS, 2001; KAY et al., 2005, SONNLEITNER; HASS, 2011), como recentemente observado em *P. fluorescens* (HUMAIR et al., 2010). Na linhagem *P. fluorescens* CHAO, o sistema de dois componentes GacS/GacA controla positivamente a expressão de três pequenos RNAs reguladores denominados RsmX, RsmY e RsmZ. Estes reguladores sequestram os repressores RsmA e RsmE, reduzindo a repressão pós-transcricional de genes alvo, por exemplo, *phlA* (envolvido na biossíntese do antibiótico 2,4-diacetilfluoroglucinol) e *aprA* (codificação da exoprotease AprA) (REIMMANN et al., 2005).

A via Gac/Rsm de transdução de sinal é parte de um mecanismo de *quorum sensing* em muitas gama-proteobacteria. Em algumas bactérias, tais como *P. aeruginosa* PAO1 (KAY et al., 2006), *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 e *Pseudomonas syringae* pv. tomate DC3000, o sistema Gac/Rsm regula a produção de sinais de N-acil-homoserina lactona, enquanto que em outras bactérias, tais como *P. fluorescens* CHAO, onde N-acil-homoserina lactonas não foram encontradas, a própria cascata Gac/Rsm proporciona uma auto-regulação positiva do sistema de *quorum sensing* (HUMAIR et al., 2010).

Em *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* foi identificado sRNA controlado pelo GacA, o RgsA (regulação por GacA e estresse). A expressão do gene *rgsA* requer o fator sigma de estresse RPOs, sendo provavelmente ativado indiretamente pelo GacA. Os 120 nucleotídeos do RgsA sRNA podem estar envolvidos na tolerância ao estresse oxidativo imposto pelo peróxido de hidrogênio (GONZÁLEZ et al., 2008).

Figura 3 - Modelos do sistema Gac / Rsm em *P. fluorescens* (a) e *P. aeruginosa* (b). A transcrição dos genes sRNA *rsm* (X) YZ é ativado por um regulador GACA de resposta, controlado por um sistema composto por quinases sensoriais (RETS e LADS). A RSM (X) YZ sRNAs inibe a função de proteína(s) de ligação-RNA proteína (s) RSMA (e RSME). A expressão do sRNAs está sob o controle de elementos adicionais regulatórios.

Seta para baixo, controle positivo; linhas perpendiculares, controle negativo; linhas tracejadas, controle indireto. Fonte: Sonnleitner e Hass, 2011.

1.3.4 Técnicas moleculares para estudo de comunidades microbianas

A aplicação de técnicas baseadas na detecção e análise da diversidade de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) presentes em amostras ambientais é fundamental

nos estudos de diversidade microbiana, principalmente por permitir a análise de maneira independente do cultivo microbiano presentes nas amostras, o que exclui todos os problemas e limitações devido à baixa culturabilidade das comunidades bacterianas. Em bactérias, o gene 16S ribossomal (16S rRNA) é o mais amplamente utilizado, considerado uma importante molécula para o estudo de filogenia e ecologia microbiana (LOUWS et al., 1999). A diversidade bacteriana foi acessada em vários ambientes baseando-se nos genes 16S rRNA das espécies microbianas componentes destas comunidades, revelando a grande diversidade que deixa de ser explorada quando apenas os métodos baseados em cultivo são aplicados (HEAD, 1998; PROSSER et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008). No entanto, o estudo focado neste gene não fornece dados sobre a funcionalidade do grupo ou espécie microbiana no ambiente avaliado.

Para suprir informações mais correlatas com a funcionalidade de grupos bacterianos, novos genes vêm sendo utilizados em estudos de microbiologia molecular, sendo alvo para o desenvolvimento de *primers* específicos. Estes *primers* permitem o estudo da diversidade do grupo funcional no ambiente, por sequenciamento de bibliotecas de clones.

1.3.4.1 Construção e análise de biblioteca de clones

A técnica de construção e sequenciamento de bibliotecas de clones de genes é uma ferramenta de alta sensibilidade no estudo de comunidades microbianas. (SCHLOSS, 2005). No entanto, a maioria dos trabalhos utiliza como alvo os genes ribossomais, com posterior comparação entre genótipos de micro-organismos presentes em diferentes amostras. Utilizando esta técnica para estudos de comunidades bacterianas foi possível determinar a diversidade de bactérias que colonizam a superfície de folhas de árvores na floresta Atlântica (LAMBAIS et al., 2006). De maneira similar, porém utilizando a técnica de pirosequenciamento, a comunidade bacteriana presente no perfil de profundidade do oceano foi descrita (SOGIN et al., 2006), onde os autores também descrevem uma rara e inexplorada diversidade de espécies compondo estas comunidades.

Diversos grupos microbianos funcionais têm sido estudados por meio da clonagem e sequenciamento de *amplicons* provenientes de DNA de amostras ambientais. A diversidade de genes PKS vem sendo estudada em amostras

ambientais, sendo encontrados estudos conduzidos com amostras de solo e bactérias associadas às esponjas marinhas. A partir de uma biblioteca metagenômica de solo, foram avaliados mais de 60 mil clones, que revelaram a presença de 139 genes PKS do tipo I, dos quais 40 foram sequenciados revelando baixas similaridades com as seqüências de PKS presentes em bancos de dados (GINOLHAC et al., 2004; KIM; FUERST, 2006).

1.3.4.2 Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante (DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

O DGGE é um método de estudo utilizado em levantamentos e comparações na composição e diversidade de comunidades microbianas (RANJARD et al., 2000). A técnica de DGGE separa *amplicons* de PCR de tamanhos similares com base na diferença de composição de seqüências em um gel com gradiente de desnaturação (MUYZER et al., 1993). A técnica apresenta alta resolução na qual um grande número de amostras pode ser rapidamente comparado revelando a dinâmica de comunidades microbianas (MUYZER; SMALLA, 1998).

No início do desenvolvimento da técnica as comparações entre comunidades bacterianas eram feitas utilizando *primers* para o domínio Bacteria, os chamados *primers* universais (HEUER et al., 1997, MUYZER et al., 1993). Posteriormente, alguns *primers* grupo-específico foram descritos, tendo como principais vantagens a acessibilidade de determinadas populações bacterianas separadamente e também uma melhor definição de perfis nas análises de comunidades bacterianas complexas, como as presentes no solo e na rizosfera. Alguns *primers* selecionam grandes grupos bacterianos, como as classes α , β -proteobacteria (GOMES et al., 2001). De maneira mais específica, *primers* foram desenvolvidos para acessar populações mais restritas, como por exemplo, gêneros dentre os quais podem ser citados os *primers* específicos para os gêneros *Pseudomonas* (MILLING et al., 2004) e *Burkholderia* (SALLES et al., 2002). Todos estes *primers*, tanto universais como os grupo específicos, foram desenvolvidos tendo como base o gene 16S ribossomal. Genes funcionais também têm sido utilizados para estudo do perfil de comunidades microbianas por meio da técnica de DGGE. O gene *gacA* é altamente conservado no gênero *Pseudomonas* (de SOUZA et al., 2002), e foi utilizado em estudo de

diversidade por meio da aplicação da técnica de DGGE em amostras de rizosfera de morangueiro (COSTA et al., 2007).

CAPÍTULO 2 - DIVERSIDADE DE *Pseudomonas* spp. DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS E DETECÇÃO DO GENE *gacA*

2. 1 INTRODUÇÃO

Os manguezais são ecossistemas particulares que se estabelecem em regiões tropicais costeiras de todo o globo, originando-se a partir do encontro de águas doces e salgadas, formando águas salobras. O Brasil tem uma das maiores extensões de manguezais do mundo, ocorrendo desde o Cabo Orange no Amapá, se estendo ao longo do litoral Sudeste-Sul brasileiro, margeando estuários, lagunas e enseadas, culminando no Município de Laguna, em Santa Catarina.

Diferentes atividades antropogênicas podem afetar a diversidade da microbiota desse ecossistema, incluindo, por exemplo, a urbanização, industrialização, a carcinicultura e a poluição ambiental. Iniciativas que priorizem levantar dados sobre a diversidade e potencial biotecnológico dos recursos microbianos desse ambiente podem fornecer informações fundamentais e inéditas para auxiliar programas de bioprospecção, ou mesmo de conservação ambiental, permitindo a exploração sustentável e racional da rica diversidade microbiana em manguezais, e a descoberta de novas moléculas com atividades biológicas. Mesmo com o desenvolvimento de técnicas independentes de cultivo, a maioria dos estudos acessa apenas a diversidade das comunidades microbianas em manguezais, focando as análises em genes ribossomais, como 16S rRNA, inferindo sobre alterações na composição destas comunidades. No entanto, as frações funcionais da comunidade microbiana presente nos manguezais ainda são pouco exploradas.

Em outros ambientes, como água, solo e compostagens, estudos acessam genes funcionais para determinar a estrutura destas populações, bem como inferir sobre fatores que podem alterar a composição destas comunidades. Adicionalmente, os poucos estudos enfocando a funcionalidade da microbiota em ambientes estuarinos não avaliam este fato nas condições brasileiras. Dentre as diferentes funções que podem conferir vantagens adaptativas aos micro-organismos em um manguezal, está a produção de moléculas que regulam a interação entre diferentes espécies microbianas neste ambiente, mantendo as comunidades microbianas estáveis e funcionais.

Recentemente, abordagens independentes de cultivo vêm sendo utilizadas na triagem de genes de produção de novos compostos bioativos em amostras

ambientais. Genes como o regulador global de *gacA*, têm sido utilizados para estudo de populações de *Pseudomonas* produtoras de metabólitos secundários (antibióticos).

A utilização de um gene funcional para estudo de um grupo específico, as *Pseudomonas* spp., pode fornecer informações importantes sobre a ecologia deste gênero em manguezais. As *Pseudomonas* spp. são bactérias que apresentam grande potencial biotecnológico, sendo conhecidas como promotoras de crescimento vegetal, agentes de controle biológico, produtoras de biossurfactantes, produtoras de biopolímeros, produtoras de enzimas de interesse industrial e com grande importância na biodegradação de hidrocarbonetos.

Desta forma, este estudo teve como objetivo utilizar o gene *gacA* para bioprospecção de substâncias bioativas, identificando e caracterizando as comunidades de *Pseudomonas* spp. existentes nos sedimentos de manguezais do Estado de São Paulo que possuem esse potencial biotecnológico.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Caracterização da área de estudo e amostragem

No presente estudo foram avaliadas as comunidades de *Pseudomonas* spp. presentes em três manguezais localizados no Estado de São Paulo, sendo dois no município de Bertioga e um no município de Cananéia (Tabela 2 e Figura 4). Estes manguezais apresentam características diferentes, sendo que em Bertioga, um manguezal está em estado natural, enquanto que o outro sofreu o impacto causado por derramamento de 35 milhões de litros de petróleo em 1983, e a mata nativa apresenta-se ainda em regeneração. O manguezal localizado na cidade de Cananéia encontra-se situado em área de reserva ambiental na Ilha do Cardoso, tendo como fator externo de impacto apenas um baixo efeito antrópico.

Tabela 2 - Localização geográfica dos manguezais amostrados no estado de São Paulo.

	Bertioga Contaminado	Bertioga	Cananéia
Latitude	23°53' 49' S	23°54' 06' S	25°05' 02' S
Longitude	46°12' 28' W	45°15' 03' W	47°57' 42' W

Figura 4 - Mapa do estado de São Paulo.

O mapa destaca as cidades onde se encontram os manguezais avaliados neste estudo.

Dos três manguezais foram obtidas amostras de sedimento para as análises das comunidades de *Pseudomonas* funcionais. Foram coletadas amostras de sedimento (superficial, aproximadamente 0-20 cm) em três pontos de cada manguezal (Ponto 1: próximo ao mar ou rio, Ponto 2 no centro do manguezal e Ponto 3 na área próxima ao Continente), sendo coletadas três amostras por ponto (Figura 5), com um total de 27 amostras.

Figura 5 - Esquema dos pontos de amostragem de sedimentos de manguezais estudados.

Para caracterização das amostras de sedimentos de manguezais foram realizadas análises físico-químicas de cada ponto amostrado (9 pontos). Estas análises foram realizadas com a colaboração do Laboratório de Análises de Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq/USP, Piracicaba) de acordo com a metodologia descrita por Van Raij et al. (2001, Tabela 3).

Tabela 3 - Características físico-químicas de amostras de sedimentos de manguezais utilizadas neste estudo.

Parâmetros	Manguezais								
	Bertioga Contaminado			Bertioga			Cananéia		
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
Areia:silte:argila	34:60:6	69:26:05	35:50:15	71:24:05	59:36:05	57:38:05	22:26:52	82:06:12	78:12:10
pH	6,90	6,80	6,40	7,10	6,80	6,90	5,90	6,40	6,30
Umidade (%)	65,16	69,66	48,26	73,97	78,39	75,82	69,9	40,79	49,18
M.O (%)^a	10,86	12,89	10,89	10,28	9,89	11,43	7,54	5,43	6,35
Carbono (%)	6,03	7,16	6,05	5,71	5,5	6,35	13,92	5,1	6,95
Nitrogênio (%)	0,13	0,45	0,31	0,29	0,26	0,34	0,72	0,21	0,23
Enxofre (%)	0,31	0,36	0,32	0,24	0,26	0,20	0,23	0,14	0,14
C.E (mS)^b	7,77	8,01	8,84	5,56	8,22	8,36	20,81	11,42	3,54
Salinidade (%)	0,47	0,46	0,48	0,30	0,46	0,46	1,26	0,68	0,17

^a M. O., Matéria Orgânica; ^b C.E, Condutividade Elétrica.

As diferentes amostras tiveram suas respectivas diversidades de *Pseudomonas* avaliadas por meio do isolamento, DGGE e do sequenciamento de clones componentes das bibliotecas genômicas.

2.2.2 Triagem de *Pseudomonas* spp. cultiváveis produtoras de compostos bioativos

Foi realizada uma triagem direcionada para o gênero *Pseudomonas* sp., a partir de isolamento específico em meio KB para seleção das fluorescentes, potenciais produtoras de antibióticos. As linhagens foram investigadas quanto ao seu potencial para produção de compostos bioativos, tanto por meio de técnicas moleculares, utilizando o gene *gacA* como alvo para seleção das linhagens, quanto

pela extração e determinação da atividade destes metabólitos. Para tanto, foram adotadas as metodologias descritas a seguir.

2.2.2.1 Isolamento de *Pseudomonas* sp. cultiváveis de sedimentos de manguezais

O isolamento de *Pseudomonas* cultiváveis de amostras de sedimento dos três manguezais analisados (item 4.2.1) foi realizado pelo método de diluição em placas. Após a coleta, 2g de sedimento de cada amostra (mistura de 3 amostragens por ponto) foram colocados em erlenmeyers esterilizados contendo 18 mL de tampão PBS (tampão fosfato “phosphate buffered saline” - 1,44 g/L de Na_2HPO_4 ; 0,24 g/L de KH_2PO_4 ; 0,20 g/L de KCl; 8,00 g/L de NaCl; pH 7,4). Os erlenmeyers foram mantidos à 28°C sob agitação (100 rpm), durante 30 minutos. Decorrido este intervalo de tempo procedeu-se uma diluição seriada fator 10.

Para o isolamento de *Pseudomonas*, alíquotas de 100 µL de cada diluição da suspensão de sedimento foram semeadas em triplicata, em placas de petri contendo meio KB (KING et al., 1954) modificado para seleção de *Pseudomonas* fluorescentes (King B – Difco – 20 g/L de proteose peptona nº 03; 10 mL/L de glicerol; 1,5 g/L de KH_2PO_4 ; 1,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 18 g/L de ágar, suplementado com: 0,1 g/L de ciclohexamida; 0,05 g/L de ampicilina; 12,5 mg/L de cloranfenicol e 5 mg/L de PCNB - Kobutol), sendo então incubadas a 28°C por 8 dias. Após o crescimento bacteriano, as colônias bacterianas foram selecionadas ao acaso, purificadas e preservadas no mesmo meio de isolamento (TUIITE, 1969).

2.2.2.2 Extração de DNA genômico de culturas puras de bactérias

A extração de DNA genômico dos isolados bacterianos foi feita a partir de culturas líquidas em meio King's B, centrifugadas após 24hs de crescimento sob agitação a 28°C. As células precipitadas foram ressuspensas em TE pH 8,0 (Tris HCl 10mM e EDTA 1 mM), sendo adicionado 30µL de SDS 10% e 0,5g de sílica e, agitado em “bead beating” por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 500 µL de fenol saturado, homogenizados e centrifugados (9700 g por 30 segundos). A fase superior foi transferida para um novo tubo, sendo adicionados 200 µL de fenol e 200 µL de clorofórmio, homogenizados e centrifugados (9700g por 5 minutos). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, sendo adicionados NaCl 5M (10%

do volume) e isopropanol (60% do volume). Os tubos foram incubados por 5 minutos a 4°C e centrifugados por 10 minutos a 9700g. O sobrenadante foi descartado e o DNA lavado com 400 µL de etanol 70%, centrifugado por 2 minutos a 9700g. O DNA seco foi ressuspensionado em 50 µL de água deionizada autoclavada e estocado à -20°C.

2.2.2.3 Amplificação do gene *gacA* em linhagens de *Pseudomonas* spp.

Especificamente para o grupo *Pseudomonas*, foram utilizados *primers* para a detecção do gene regulador global *gacA* (SOUZA et al., 2003; COSTA et al., 2007). Para tanto, o DNA total foi submetido a reação de PCR com volume de 50 µL, contendo 1 µL de DNA molde; 5 µL de tampão para PCR 10x; 0,2 µM dos primers *gacA1F* (5'-TGA TTA GGG TGY TAG TDG TCG A-3') e *gacA2* (5'-MGYCARYTCVACRTCRCCTGATG-3'); 0,2 mM de cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP; 3,75 mM de MgCl₂; 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas), 0,25 µL de BSA 100x e 2,5 µL de dimetilsulfoxido (DMSO). A mistura foi colocada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc. USA), programado para gerar uma desnaturação inicial em 5 minutos a 95 °C, e 30 ciclos de 94 °C, 1 minuto; 57 °C por 1,5 minutos; 72 °C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Após o término, 5 µL da reação foram utilizados para observação em gel de agarose (1,2%) de um fragmento de aproximadamente 600 pb. A partir de então, os produtos de PCR foram purificados com *AccuPrep*® PCR Purification kit (BIONEER, EUA) e submetidos ao sequenciamento junto a Divisão de Recursos Genéticos Microbianos do CPQBA da UNICAMP, com a colaboração da Profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira.

2.2.2.4 Amplificação do gene *16S rRNA* de *Pseudomonas* spp.

As linhagens positivas para o gene *gacA* foram selecionadas e seu DNA amplificado para o gene de 16S rRNA de *Pseudomonas*, conforme metodologia descrita por Milling et al. (2004). Para tanto, o DNA total foi submetido à reação de PCR com volume de 50 µL, contendo 1 µL de DNA molde; 5 µL de tampão para PCR 10x; 0,2 µM dos primers F311 Ps (CTGGTCTGAGAGAGGATGATCAGT) e R1459 (AATCACTCCGTGGTAACC); 0,2 mM de cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP; 3,76 mM de MgCl₂; 5,0 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas). A mistura foi

colocada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc. USA), programado para gerar uma desnaturação inicial em 7 minutos a 94 °C, e 30 ciclos de 94 °C, 1 minuto; 63 °C por 1 minuto; 72 °C por 2 minutos, seguidos de uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Após o término, 5 µL da reação foram utilizados para observação em gel de agarose (1,2%) de um fragmento de aproximadamente 1150 pb. Os produtos de PCR foram purificados com *AccuPrep*® PCR Purification kit (BIONEER, EUA) e submetidos ao seqüenciamento junto a Divisão de Recursos Genéticos Microbianos do CPQBA da UNICAMP, com a colaboração da Profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira.

2.2.2.5 Análise das sequências

Para a análise das sequências do gene *gacA* dos isolados, foi utilizado o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (www.ncbi.nlm.nih.gov) contra o banco de dados do GenBank da coleção de nucleotídeos (nr/nt), que compara a seqüência submetida à base de dados. De modo a avaliar a similaridade das seqüências dos isolados obtidos com seqüências conhecidas do GenBank, foi utilizado o programa Mega 4.0 (TAMURA et al., 2007). O alinhamento foi realizado com a utilização do aplicativo ClustalW (THOMPSON et al., 1994).

As seqüências do gene de 16S rRNA dos isolados foram analisadas no site *Ribosomal Database Project II* (RDP II) versão 10 (<http://rdp.cme.msu.edu>) para edição e remoção de seqüências com baixa qualidade (COLE et al., 2009). O nível de exigência mínima foi de 350 bases com qualidade Phrap acima de 20 (1 erro a cada 100 bases lidas) para posteriores análises.

2.2.2.6 Identificação de linhagens de *Pseudomonas* pela extração de ácidos graxos da membrana celular (FAME)

As linhagens bacterianas *gacA* positivas que não puderam ser identificadas pelo seqüenciamento do gene de 16S rRNA, foram caracterizadas pelo perfil de ácidos graxos da membrana celular com o objetivo de identificar as espécies isoladas e selecionadas. Para a análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular, as bactérias foram inoculadas em meio TSBA®BBL e incubadas a 28 °C, por 24 h. Decorrido este tempo, foram coletadas 4 a 6 alças do terceiro quadrante e transferidas para tubos Kimax.

As amostras foram então processadas em quatro etapas para extração dos ácidos graxos celulares, sendo elas: saponificação, metilação, extração e lavagem. Inicialmente, adicionou-se, 1 mL do reagente de saponificação, agitou-se durante 10s. Os tubos foram colocados em banho-Maria 95-100 °C, por 5 minutos. Em seguida os tubos foram resfriados em água e novamente agitados por 10 s, retornando ao banho-Maria, por mais 25 minutos. Após resfriamento em água, adicionou-se 2 mL do reagente de metilação. Os tubos foram agitados 10 s e colocados em banho (80±1) °C, por 10 minutos; seguido por resfriamento em água. Adicionou-se 1,25 mL do reagente de extração e colocaram-se os tubos no rotator clínico (FISHER M346) por 10 minutos. A fase inferior (aquosa) foi descartada e adicionado ao tubo 3 mL do reagente de lavagem básica, retornando os tubos para o rotator clínico por mais 5 minutos. Ao fim deste tempo, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm (3 min), quando 2/3 da fase superior (0,5 mL) foi transferido para os *vials* (2 mL).

Na análise foi utilizado cromatógrafo gasoso com injetor automático e detector *Flame Ionization Detector* (FID), marca Agilent, modelos 6850 e 7683, respectivamente. A interface foi obtida pelos programas *ChemStation* A0901[1206] e *Sherlock* 4.0. O método e a biblioteca selecionados foram o TSBA6.

Os isolados foram identificados por meio do “Software” de Identificação Microbiana (MIDI, Biblioteca Sherlock® TSBA versão 6.10, Microbial ID, Newark, DE, USA). Os perfis dos ácidos graxos obtidos foram comparados com os dados contidos na biblioteca TSBA50 (linhagens de referência armazenadas na biblioteca). Isolados com índices de similaridade (IS) iguais ou superiores a 0,7 foram identificados ao nível de espécie, enquanto para índices inferiores, estes isolados foram afiliados a grupos taxonômicos superiores como gênero ou família (HEYRMAN et al., 1999). Esta análise foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente.

2.2.2.7 Análise dos extratos orgânicos das bactérias selecionadas

2.2.2.7.1 Obtenção de extratos orgânicos

A partir da identificação de bactérias cultivadas, linhagens tipo de *Pseudomonas gacA* positivas foram selecionadas para caracterização da expressão

desse gene e verificação do potencial biotecnológico das *Pseudomonas* isoladas neste estudo. As linhagens 19, 24, 27, 30, 36, 50, 67 e 71 foram cultivadas em 500 mL de meio líquido (TSB). O meio foi incubado em um shaker (28 °C/150 rpm), por 96 horas. Após o crescimento da bactéria, o meio foi centrifugado em centrífuga refrigerada SORVALL (10000 rpm a 28 °C), para se obter os componentes químicos liberados pelo metabolismo destes micro-organismos presentes no sobrenadante, sendo o resíduo sólido descartado.

Do sobrenadante, foi ajustado o pH para 3,0, seguida pela extração com o solvente acetato de etila, em funil de separação. Esse processo foi repetido três vezes para cada operação. Posteriormente, o mesmo foi realizado em pH básico (pH 12,0). Após a evaporação do solvente em evaporador rotatório, foram obtidos os extratos brutos (MELO; SANHUEZA, 1995) para realização dos testes de antibiose.

2.2.2.7.2 Avaliação da atividade biológica de extratos brutos de *Pseudomonas*

*2.2.2.7.2.1 Teste de antibiose de linhagens de *Pseudomonas* sp. contra fitopatógenos*

Para a avaliação da atividade biológica dos extratos brutos de *Pseudomonas* foi utilizado o método de difusão em ágar, no qual, o potencial de inibição dos fitopatógenos *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* pelos metabólitos produzidos pelas linhagens de *Pseudomonas* foi observado. No teste, 20 µL (14 mg/ mL) dos extratos brutos eluidos em aceto de etila, obtidos das linhagens de *Pseudomonas* selecionadas, foram aplicados a discos (6 mm diâmetro Ø) autoclavados e dispostos na placa de Petri com meio BDA. Ao centro da placa, foram repicados os fitopatógenos. O procedimento foi realizado em triplicata para cada um dos fitopatógenos em estudo. Os tratamentos controle receberam somente o solvente acetato de etila. A avaliação foi realizada de acordo com o crescimento dos fitopatógenos, no período de 24hs à 120 hs, sendo então observada a presença do halo de inibição.

*2.2.2.7.2.2 Teste de Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos extratos brutos de *Pseudomonas* contra bactérias patogênicas*

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) do extrato bruto em acetato de etila das linhagens de *Pseudomonas* sp. foi determinado pelo método de diluição, conforme recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, NCCLS, 1994. Diferentes concentrações dos extratos brutos em acetato de etila foram testadas para cada bactéria Gram positiva (*Enterococcus* sp. e *Staphylococcus aureus*) e Gram negativa (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* e *Klebsiella* sp.), em microplacas com 96 orifícios contendo meio Mueller-Hinton, incubadas a 28 °C por 24 horas. O crescimento microbiano foi determinado pela revelação com cloreto 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolium (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.). A concentração mínima inibitória é definida como a menor concentração das amostras testadas com inibição completa de crescimento do patógeno.

2.2.3 Atividade enzimática de linhagens de *Pseudomonas* spp.

2.2.3.1 Atividade amilolítica

Preparou-se o meio Agar nutriente, contendo 0,2% de amido solúvel (suspensão aquecida) em pH 6,0. Culturas puras com 24 hs de crescimento foram inoculadas no meio de cultura e incubadas a 30 °C $\pm$ 2, por 5 dias. Observado o crescimento da colônia, foram então adicionados 2 mL da solução de Lugol para verificação do halo de degradação do amido pelas bactérias. As culturas que demonstraram resultado positivo apresentavam uma zona amarelada ao redor do fundo roxo. O teste foi realizado em triplicata (FERREIRA et al., 2002).

2.2.3.2 Atividade celulolítica

Para avaliação da atividade ceculolítica foi utilizado meio de cultura composto por: 1g de (NH₄)₂SO₄, 1g de K₂HP O₄, 5g de MgSO₄, 1 mg de NaCl, 15 g de ágar e 10g de carboximetil-celulose em 1 L de água destilada. Culturas com 24 hs de crescimento foram inoculadas ao meio de cultura e incubadas por 3 dias ($\pm$ 28 °C) no escuro. A atividade foi verificada pela observação de zonas alaranjadas ao redor da colônia, após a aplicação da solução de vermelho Congo (0,1g de vermelho congo em 100 mL de água destilada) colocada sob a superfície das placas por um período de 2 hs (RYCKEBOER et al., 2003). O teste foi realizado em triplicata.

2.2.3.3 Atividade de fenoloxidasas – lacase

Para avaliação da atividade de lacase foi utilizado meio de cultura contendo: 20g de ágar acrescido de 0,5% (p/v) de ácido gálico, 15g de extrato de malte e 1g de peptona em 1L de água. Para o preparo do meio, o ácido gálico foi homogeneizado em 50 mL de água destilada e autoclavado a 120 °C, 1 atm, por 10 min. Os demais reagentes foram solubilizados (pH 7,0) e autoclavados a 120 °C, 1 atm, por 20 min. Culturas com 24 hs de crescimento foram inoculadas ao meio de cultura e incubadas por 10 dias (± 28 °C) no escuro. O teste foi considerado positivo para colônias que formam ao seu redor um halo marrom escuro (Reação de Bavendamm), sendo realizado em triplicata (SANTOS, 2007).

2.2.3.4 Atividade lipolítica

Para preparo do meio de cultura, adicionou-se 10 g de peptona, 5 g de NaCl, 0,1 g de CaCl_2 , e 20 g de agar em 1 L de água destilada. O Tween 20 esterilizado foi utilizado como substrato lipídico, sendo adicionado ao meio na proporção de 1:100. Culturas com 24 hs de crescimento foram inoculadas ao meio de cultura e incubadas por 5 dias no escuro. O aparecimento de halo claro ao redor da colônia resultou da formação de cristais de cálcio de ácido láurico, liberado pela reação da enzima e pela completa degradação dos sais lipídicos. Para melhor observação do halo de degradação adicionou-se 2 mL da solução de vermelho de fenol. O teste foi realizado em triplicata.

2.2.3.5 Teste da catalase

Para o teste da catalase, foi adicionado sobre o inoculo 1 gota de H_2O_2 (30%) e observada a ocorrência da produção de gás (borbulhamento) imediatamente, o que indica resultado positivo, isto é, se a bactéria é capaz de produzir a enzima catalase, responsável pela decomposição de peróxido de hidrogênio produzido pelas células durante o metabolismo.

2.2.4 DGGE (Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante)

2.2.4.1 Extração de DNA Genômico de Sedimento

Para extração do DNA das amostras de sedimento, foi utilizado *Power Soil DNA kit* (MoBio, EUA), seguindo metodologia descrita pelo fabricante. Após a extração, a integridade e a qualidade dos DNAs obtidos foram verificadas em eletroforese em gel de agarose 1% (w/v), seguida pela coloração em brometo de etídeo e visualização em luz ultravioleta.

2.2.4.2 Amplificação do gene 16S rRNA de *Pseudomonas* para DGGE

Para amplificação do gene 16S, o DNA total foi submetido a reação de PCR com volume de 50 μ L usando os primers F311 Ps (CTGGTCTGAGAGAGGATGATCAGT) e R1459 (AATCACTCCGTGGTAACC), específicos para *Pseudomonas*, conforme metodologia de Milling et al. (2004) descrita no item 2.2.2.4. O produto de PCR obtido foi submetido a uma reamplificação com volume de 50 μ L, contendo 1 μ L de DNA molde; 5 μ L de tampão para PCR 10x; 0,2 μ M dos primers R1387 (HEUER; SMALLA, 1997) e U968 $\pm$ GC (HEUER; SMALLA, 1999); 0,2 mM de cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP (Pharmacia); 3,75 mM de MgCl₂; 5,0 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 1,0 μ L de BSA 100x e 0,5 μ L de formamida. A mistura foi colocada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc. USA), programado para gerar uma desnaturação inicial em 5 minutos a 94 °C, e 30 ciclos de 94 °C, 1 minuto; 55 °C por 30 segundos; 72 °C por 2 minutos, seguidos de uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Após o término, 5 μ L da reação foram utilizados para observação em gel de agarose (1,2%) de um fragmento de aproximadamente 450 pb.

A análise de DGGE foi realizada como descrito por Muyzer et al. (1993) e adaptado por Araújo et al. (2002) no aparelho *Ingeny PhorU2 system* (Ingeny, Goes, Holanda) da Embrapa Meio Ambiente. Os produtos de PCR foram colocados em gel vertical de poliacrilamida 6% com gradiente desnaturante de uréia/formamida de 45-65%, a 60 °C, numa eletroforese de 15 h a 100 V. Após este período, o gel foi corado com nitrato de prata (BLUM et al., 1987).

2.2.4.3 Amplificação do gene *gacA* para DGGE

Inicialmente os DNAs genômicos previamente extraídos das amostras de sedimentos de manguezais (item 2.2.4.1) foram submetidos à amplificação com

primers específicos para o gene de interesse (*gacA*) (de SOUZA et al., 2003; COSTA et al., 2007), como descrito no item 2.2.2.3. A amplificação foi verificada em gel de agarose, seguido de coloração em brometo de etídeo e visualização em luz ultravioleta.

Para a realização da metodologia de DGGE, foi realizada uma *NESTED-PCR* utilizando os iniciadores *gacA*-1FGC (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-GAT TAG GGT GCT AGT GGT CGA-3') e *gacA*-2R (5'-GGT TTT CGG TGACAG GCA-3') conforme metodologia descrita por Costa et al. (2007). Os amplicons da primeira reação (599-bp) foram usados como moldes para um segundo PCR. A reação (25 µl) consistiu em 1 µl de DNA da primeira reação, 5 µL de tampão para PCR 10x, 0,2mM de dNTPs, 3,75 mM de MgCl₂, 5% (p/v) DMSO, 0,2 mM dos *primers* *gacA*-1FGC e *gacA*-2R e 2.5 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas). A mistura foi colocada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc. USA), programado para gerar uma desnaturação inicial em 5 minutos à 94 °C, depois 25 ciclos de 1 minuto à 95 °C, 1,5 minutos à 52 °C e 1,5 minutos à 72 °C foram executados. Uma etapa final da extensão de 10 minutos à 72 °C terminou a reação. Posteriormente a verificação dos produtos do PCR (575 bp, com grampo GC incluído) em gel de agarose, as amostras foram submetidas à análise de DGGE.

A análise de DGGE foi realizada como descrito por Muyzer et al. (1993) e adaptado por Araújo et al. (2002) no aparelho *Ingeny PhorU2 system* (Ingeny, Goes, Holanda) da Embrapa Meio Ambiente. Os produtos de PCR foram colocados em gel vertical de poliacrilamida 6% com gradiente desnaturante de uréia/formamida de 45-65%, a 60 °C, numa eletroforese de 15 h a 100 V. Após este período, o gel foi corado com nitrato de prata e fotodocumentado.

2.2.4.4 Análise estatística do DGGE

A análise multivariada foi utilizada para correlacionar os fatores ambientais com a ocorrência de bandas no DGGE utilizando o Canoco 4.5 (Ter BRAAK; SMILAUER, 1998). A matriz de bandas foi considerada como representante de espécies e as variáveis ambientais, como locais amostrados (manguezais e pontos de coleta), foram utilizados como fatores nominais, no estudo da comunidade de *Pseudomonas* em sedimentos de manguezais. Com esse conjunto de dados, foi

primeiramente realizada uma análise de correlação (DCA) entre as amostras e as variáveis (ANDREOTE et al., 2009), que forneceu informações sobre a distribuição dos dados de espécie.

Em cada análise, o teste estatístico de permutação de Monte Carlo foi aplicado considerando 499 permutações aleatórias, permitindo avaliar a significância (valor p), dos fatores ambientais na distribuição das espécies nas amostras. Na análise do DGGE para 16S rRNA de *Pseudomonas* onde a distribuição foi linear (valor do primeiro eixo < 4,00), a análise multivariada foi realizada por análise de redundância (RDA), enquanto que para o DGGE do gene *gacA*, o modelo matemático foi de correspondência canônica (CCA). Na CCA e RDA também foram obtidos os valores de lambda-1, que mostram as porcentagens de variância que podem ser explicadas pelos fatores ambientais de forma independente.

2.2.5 Construção de biblioteca de clones 16S RNAr de *Pseudomonas*

Os DNAs obtidos de cada uma das extrações de amostras de sedimento (item 2.2.4.1) foram utilizados na construção de quatro bibliotecas de clones do gene de 16S RNAr de *Pseudomonas* (compreendendo o sedimento do manguezal de Cananéia, o sedimento de Bertioga, o sedimento de Bertioga Contaminado Ponto 1 e os sedimentos de Bertioga Contaminados Pontos 2 e 3). Primeiramente os DNAs extraídos foram submetidos à amplificação com *primers* específicos para o gene 16S RNAr específico para o gênero *Pseudomonas* sp., seguindo metodologia previamente descrita (item 2.2.2.4). Com a finalidade de facilitar a introdução do inserto ao vetor de clonagem, foi adicionado o *A-tailing* ao produto de PCR. Para tanto, a mistura contendo 7 µL de DNA molde; 1 µL de tampão para PCR 10x; 1 µL do dATP (2mM) e 0,5 µL da Taq DNA Polimerase foi colocada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc. USA), por 20 min a 72 °C. Posteriormente, os produtos de amplificação, purificados com *AccuPrep*® PCR Purification kit (BIONEER, EUA), foram ligados ao vetor de clonagem utilizando o kit *InsTAclone*TM PCR Cloning Kit (Fermentas Life Sciences), de acordo com as instruções do fabricante. Os plasmídeos recombinantes foram inseridos em células competentes de *Escherichia coli* DH5α. e as colônias transformadas (coloração branca) foram selecionadas para detecção do inserto no vetor, em placas contendo LB Agar suplementado com X-Gal e ampicilina (100 µg.mL⁻¹).

2.2.5.1 Seqüenciamento da biblioteca genômica de amostras de sedimento de manguezais

A extração do DNA plasmidial dos clones foi realizada pelo método Miniprep. Para tanto, cada colônia isolada foi crescida em meio LB líquido com ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) *overnight* à 37°C , a 250 rpm. As suspensões de bactérias foram centrifugadas por 2 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e acrescentado 200 μL de solução para ressuspensão (50 mM glucose, 25 mM Tris HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0). Foi utilizada a solução para lise celular (NaOH 0,2N e SDS 1%) e em seguida homogeneizadas por inversão. Acrescentou-se então 200 μL de solução de precipitação (60 mL de acetato de potássio 5 M, 11,5 mL de ácido acético glacial e 28,5 mL de água), homogeneizando por inversão. Depois de centrifugadas por dez minutos a 14000 rpm, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e acrescentado 400 μL de isopropanol 100%. As amostras foram centrifugadas por 20 min a 14000 rpm e o sobrenadante desprezado. Acrescentou-se 500 μL de etanol 70%, seguido por centrifugação de 5 min a 14000 rpm e descarte do sobrenadante. Assim que evaporado o etanol, o DNA foi ressuspensionado em 50 μL de água destilada deionizada. Após a extração, foi feita a amplificação com os *primers* M13F e M13R. Os clones que apresentaram insertos com o tamanho de fragmento esperado foram purificados com *AccuPrep*® PCR Purification kit (BIONEER, EUA) e submetidos ao sequenciamento junto a Divisão de Recursos Genéticos Microbianos do CPQBA da UNICAMP, com a colaboração da Profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira.

2.2.5.2 Análise das seqüências e definição de UTOs

Inicialmente, seqüências de baixa qualidade ($Q < 20$) foram removidas do grupo de seqüências analisadas. As seqüências obtidas foram analisadas no VecScreen do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) para identificação e remoção dos fragmentos do vetor encontrados nas seqüências de nucleotídeos.

As seqüências válidas foram agrupadas em UTOs (unidades taxonômicas operacionais) usando o programa MOTHUR. Para tanto, as seqüências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997; LARKIN et al., 2007) e editadas com o programa CLC Sequence Viewer 6.1 (<http://www.clcbio.com>). O alinhamento obtido foi então analisado no pacote

MOTHUR quanto à similaridade e as sequências obtidas foram agrupadas em UTOs pelo método de *Furthest neighbor*, considerando que cada sequência dentro de uma UTO apresente no máximo 0.03 de dissimilaridade. Outro tipo de análise foi a comparação de bibliotecas construídas a partir de diferentes amostras de sedimentos de manguezais (Bertioga não contaminado, Bertioga contaminado ponto 1, Bertioga contaminado pontos 2 e 3 e Cananéia), por meio da aplicação de programas como o Libshuff (<http://libshuff.mib.uga.edu/>). Um diagrama de Venn foi elaborado para verificar as intersecções e peculiaridades das bibliotecas obtidas.

Foi realizada a comparação das sequências válidas on-line no SIMO-RDP (http://simo.marisci.uga.edu/public_db/analysis_login.asp), o organismo com maior similaridade foi selecionado para representar cada clone, conforme figura 14.

As sequências também foram analisadas através da ferramenta “Classifier” encontrada no *Ribosomal Database Project II* (RDP II) versão 10 (<http://rdp.cme.msu.edu>) (COLE et al., 2009) para obter-se a classificação taxonômica das sequências obtidas. A classificação pelo RDP segue o sistema taxonômica (RDP Hierarchy) que segue a proposta do Manual Bergeys (GARRITY et al., 2004), no qual os principais domínios taxonômicos são: Domínio, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Isolamento, detecção do gene *gacA* e diversidade de *Pseudomonas* spp.

No isolamento seletivo em meio King's B para o gênero *Pseudomonas* foram obtidos 83 isolados em amostras de manguezais do Estado de São Paulo, sendo 55 (66,27%) destes isolados positivos para o gene *gacA* (regulador global da síntese de antibióticos). A análise das sequências de DNA amplificadas para o gene *gacA*, utilizado neste estudo para seleção de linhagens com potencial para produção de antibióticos em ambientes de manguezais, geraram identidade baixa quando comparadas as sequências do banco de dados do NCBI pelo BlastN (Tabela 4), não permitindo a identificação das linhagens com base neste gene.

Os isolados foram caracterizados por meio da amplificação de regiões específicas para *Pseudomonas* sp. (MILING et al., 2004) do gene 16S rRNA. Assim, após análise das sequências do gene 16S rRNA das linhagens *gacA* positivas,

somente 18 foram caracterizadas em espécie, pois apresentaram mais de 97,5% de similaridade (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994) com o banco de dados do RDP e outras 22 puderam ser caracterizadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. (Tabela 4).

A análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAMES) foi utilizada para confirmação desses resultados. Com base nesta técnica, mais onze linhagens puderam ser caracterizadas (Tabela 4), sendo identificadas como *P. fluorescens* (linhagens 35, 59, 69, 71 e 77), *P. putida* (linhagem 58), *P. stutzeri* (linhagem 67), *P. mucidolens* (linhagens 14 e 50) e as fitopatogênicas *P. syringae* (linhagem 68) e *P. savastanoi* (linhagem 61).

A linhagem 73, caracterizada pelo gene 16S rRNA como *P. fulva* (96,98%), foi identificada pelo FAMES como *P. putida* (Tabela 4 e Figura 6).

Foi obtido maior número de isolados *gacA* positivos no sedimento de manguezal de Cananéia (Tabela 4). No entanto, a maior riqueza de espécies pode ser observada no manguezal de Bertioga contaminado (Figura 7). Com base no gene de 16S rRNA e FAMES, foram caracterizadas as espécies *P. fluorescens*, *P. fulva*, *P. putida*, *P. plecoglossicida*, *P. stutzeri*, *P. mucidolens*, *P. syringae* e *P. savastanoi* isoladas de sedimentos de manguezais.

A espécie *P. putida* foi predominante entre os isolados de todos os manguezais avaliados. A espécie patogênica a plantas *P. savastanoi* foi isolada exclusivamente em Cananéia, enquanto as espécies *P. mucidolens* e *P. syringae* foram isoladas somente do manguezal de Bertioga contaminado com óleo cru (Figura 7). Dentre os isolados identificados, foi observada apenas uma linhagem de *Pseudomonas stutzeri*, obtida do manguezal de Bertioga não contaminado (Figura 7).

Tabela 4. Caracterização molecular e FAMES de *Pseudomonas* spp. isoladas de manguezais do Estado de São Paulo.

Local da Coleta	Código Isolado	16S rRNA	Acesso	Identidade (%)	Gene <i>gacA</i>	Acesso	Cobertura	Identidade (%)	FAMES	IS*
Bertioga	32	<i>P. plecoglossicida</i>	DQ095902	95,21	<i>P. putida</i>	CP002290.1	96	90		
	43	<i>P. putida</i>	FJ976601	98,58	<i>P. putida</i>	CP002870.1	97	95		
	44	<i>P. oryzihabitans</i>	EU977742	95,09	<i>P. putida</i>	CP002870.1	75	82		
	52	<i>P. putida</i>	AE015451	97,99	<i>P. putida</i>	AE015451.1	55	87		
	60	<i>P. putida</i>	AF467303	88,68	<i>P. putida</i>	CP000712.1	86	82		
	67	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	AB276372	95,90		sem similaridade			<i>P. stutzeri</i>	0,768
Bertioga Contaminado	5	<i>P. monteilii</i>	FJ560914	96,42	<i>P. putida</i>	CP002870.1	100	93		
	14	<i>P. plecoglossicida</i>	DQ095909	96,44	<i>P. putida</i>	CP000712.1	98	84	<i>P. mucidolens</i>	0,810
	26	<i>P. flavescens</i>	U01916	96,41	<i>P. putida</i>	CP002290.1	92	90		
	35	<i>P. putida</i>	GQ502786	96,05	<i>P. putida</i>	CP002290.1	68	93	<i>P. fluorescens</i>	0,830
	36	<i>P. putida</i>	GQ901886	96,86	<i>P. putida</i>	AE015451.1	95	88		
	37	<i>P. putida</i>	EU827496	98,15	<i>P. putida</i>	CP002870.1	93	89		
	38	<i>P. fulva</i>	AM411071	98,31	<i>P. putida</i>	CP002290.1	24	93	-	
	40	<i>P. mosselii</i>	FJ455453	94,81	<i>Pseudomonas</i> sp.	EF417474.1	66	81		
	41	<i>P. putida</i>	AM184230	96,56	<i>P. putida</i>	CP002290.1	76	82		
	42	<i>P. fluorescens</i>	FJ588703	97,57	<i>P. tolaasii</i>	EU677189.1	88	76		
	50	<i>P. putida</i>	CP000949	94,99	<i>P. putida</i>	CP002290.1	98	91	<i>P. mucidolens</i>	0,810
	58	<i>P. putida</i>	GQ416520	94,84	<i>P. putida</i>	CP000712.1	88	89	<i>P. putida</i>	0,906
	59	<i>P. monteilii</i>	EU877078	96,09	<i>P. putida</i>	CP002290.1	96	90	<i>P. fluorescens</i>	0,880
	68	<i>P. putida</i>	EF102848	97,15	<i>P. putida</i>	AE015451.1	94	84	<i>P. syringae</i>	0,567
	69	<i>P. putida</i>	EF102848	94,65	<i>P. putida</i>	CP002290.1	94	90	<i>P. fluorescens</i>	0,840
	70	<i>P. putida</i>	DQ141542	97,72	<i>P. putida</i>	CP002290.1	100	89		
	81	<i>P. putida</i>	EU827496	97,96	<i>P. putida</i>	CP002870.1	93	88		
Cananéia	1	<i>P. putida</i>	EF102849	96,00	<i>P. putida</i>	AE015451.1	99	92		
	12	<i>P. putida</i>	AY952323	99,19	<i>Pseudomonas</i> sp.	DQ464397.1	89	85		
	17	<i>P. putida</i>	EF102848	98,59	<i>P. putida</i>	AJ629219.1	95	90		

Continua...

Conclusão

Tabela 4. Caracterização molecular e FAMES de *Pseudomonas* spp. isoladas de manguezais do Estado de São Paulo.

Cananéia	19	<i>P. putida</i>	AY332610	97,96	<i>P. putida</i>	CP002290.1	98	92		
	24	<i>P. plecoglossicida</i>	GQ280073	98,17	<i>P. putida</i>	CP002870.1	95	98		
	25	<i>P. putida</i>	EF051575	88,03	<i>P. putida</i>	CP002870.1	98	98		
	27	<i>P. putida</i>	FJ607351	91,63	<i>P. putida</i>	AE015451.1	97	92		
	30	<i>P. putida</i>	EF208895	94,90	<i>P. putida</i>	AE015451.1	85	87		
	45	<i>P. plecoglossicida</i>	FJ529916	98,50	<i>P. putida</i>	CP002870.1	76	88		
	46	<i>P. putida</i>	EU438846	92,31	<i>P. putida</i>	CP000926.1	49	93		
	47	<i>P. putida</i>	DQ060242	96,36	<i>P. putida</i>	CP002870.1	81	86		
	48	<i>P. putida</i>	FJ950560	77,63	<i>P. putida</i>	CP002870.1	98	84		
	49	<i>P. fluorescens</i>	DQ256083	96,72	<i>P. entomophila</i>	CT573326.1	93	81		
	51	<i>P. putida</i>	EF102848	89,03	<i>P. putida</i>	CP002870.1	94	88		
	53	<i>P. putida</i>	FJ472859	93,61	<i>P. putida</i>	AE015451.1	52	88		
	54	<i>P. fluorescens</i>	DQ256083	98,56	<i>P. putida</i>	AE015451.1	97	94		
	57	<i>P. fluorescens</i>	DQ525591	99,18	<i>P. fluorescens</i>	CP000094.2	98	84		
	61	<i>P. fuscovaginae</i>	FJ151349	95,77	<i>Cupriavidus metalidurans</i>	CP000353.2	5	100	<i>P. savastanoi</i>	0,733
	62	<i>P. plecoglossicida</i>	DQ095887	96,19	<i>P. putida</i>	CP002870.1	99	92		
	63	<i>P. putida</i>	AY332610	98,69	<i>P. putida</i>	CP002870.1	99	89		
	64	<i>P. alcaliphila</i>	AJ550466	93,05	<i>P. mendocina</i>	CP002620.1	98	88		
	71	<i>Pseudomonas</i> sp.	AY646430	89,78	<i>P. putida</i>	AE015451.1	99	93	<i>P. fluorescens</i>	0,519
	72	<i>P. koreensis</i>	HQ242746	95,10	<i>P. putida</i>	AE015451.1	99	93		
	73	<i>P. fulva</i>	AB047000	96,98	<i>P. putida</i>	AE015451.1	96	90	<i>P. putida</i>	0,557
	75	<i>P. putida</i>	AY332610	98,41	<i>P. putida</i>	AJ629219.1	58	81		
	76	<i>P. jessenii</i>	AY206685	96,53	Uncultured bacterium clone	GQ323744.1	64	82		
	77	<i>P. plecoglossicida</i>	GQ280073	93,35	<i>P. putida</i>	CP002870.1	93	88	<i>P. fluorescens</i>	0,624
	79	<i>P. teessidea</i>	AM419154	93,30	<i>P. fluorescens</i>	CP000094.2	98	90		
	80	<i>Pseudomonas</i> sp.	AY259518	87,67	<i>P. entomophila</i>	CT573326.1	66	88		
	82	<i>P. putida</i>	DQ192174	98,99	<i>P. putida</i>	CP002870.1	99	90		
	83	<i>P. putida</i>	EF080874	98,78	<i>P. putida</i>	CP002870.1	87	89		

Figura 6 - Resultado da análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular da linhagem 73 / As setas indicam os ácidos graxos não classificados relacionados à espécie *P. fulva*.

Sample ID: Lu Avila 73

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.738	3.303E+8	0.027	----	7.015	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.961	281	0.022	----	7.467		----	< min rt	
2.006	997	0.028	----	7.558		----	< min rt	
2.162	5268	0.023	----	7.873		----	< min rt	
3.715	204	0.028	----	10.737		----		
4.280	3657	0.030	1.091	11.425	10:0 3OH	3.37	ECL deviates 0.003	
4.342	240	0.027	----	11.493		----		
4.803	2953	0.033	1.058	12.000	12:0	2.64	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
6.183	4658	0.036	1.005	13.176	12:0 2OH	3.95	ECL deviates -0.001	
6.559	4653	0.036	0.995	13.452	12:0 3OH	3.91	ECL deviates -0.002	
7.297	1263	0.047	0.977	13.994	14:0	1.04	ECL deviates -0.006	Reference -0.006
8.413	373	0.034	0.958	14.723	15:0 anteiso	0.30	ECL deviates 0.010	Reference 0.010
9.744	590	0.038	0.941	15.546	16:0 N alcohol	0.47	ECL deviates -0.004	
10.037	597	0.038	0.939	15.722	16:0 anteiso	0.47	ECL deviates 0.004	
10.191	41737	0.047	0.937	15.815	Sum In Feature 3	32.99	ECL deviates -0.007	16:1 w7c/16:1 w6c
10.491	38982	0.044	0.934	15.996	16:0	30.73	ECL deviates -0.004	Reference -0.005
11.742	1104	0.042	0.925	16.721	17:0 anteiso	0.86	ECL deviates -0.002	Reference -0.004
12.033	702	0.046	0.923	16.890	17:0 cyclo	0.55	ECL deviates 0.002	
13.486	364	0.035	0.916	17.718	Sum In Feature 5	0.28	ECL deviates -0.002	18:2 w6,9c/18:0 ante
13.674	17559	0.046	0.915	17.825	Sum In Feature 8	13.56	ECL deviates 0.002	18:1 w7c
13.984	6335	0.045	0.914	18.002	18:0	4.89	ECL deviates 0.002	Reference -0.003
15.228	341	0.033	----	18.714		----		
----	41737	----	----	----	Summed Feature 3	32.99	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	364	----	----	----	Summed Feature 5	0.28	18:2 w6,9c/18:0 ante	18:0 ante/18:2 w6,9c
----	17559	----	----	----	Summed Feature 8	13.56	18:1 w7c	18:1 w6c

ECL Deviation: 0.004
Total Response: 126312
Percent Named: 99.38%

Reference ECL Shift: 0.006
Total Named: 125528
Total Amount: 118526
Number Reference Peaks: 6

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA6 6.10	0.557	Pseudomonas-putida-biotype B/vancouverensis
	0.527	Pseudomonas-fluorescens-biotype A
	0.492	Pseudomonas-fluorescens-biotype B
	0.480	Pseudomonas-fluorescens-biotype C/P. mandelii
	0.440	Pseudomonas-syringae-glycinea
	0.426	Pseudomonas-syringae-tabaci
	0.421	Pseudomonas-syringae-phaseolicola
	0.419	Pseudomonas-fluorescens-biotype G/taetrolens
	0.368	Pseudomonas-syringae-syringae
	0.340	Grimontia-hollisae (Vibrio)

Figura 7 - Diversidade de *Pseudomonas* spp. isoladas de sedimentos de manguezais do estado de São Paulo.

À direita, o gráfico representa os três manguezais. O tamanho dos gráficos está relacionado ao número total de isolados obtidos em cada manguezal amostrado.

2.3.2 Atividade antimicrobiana de extratos brutos de linhagens de *Pseudomonas* spp.

Visando a obtenção de linhagens de *Pseudomonas* isoladas de sedimentos de manguezais produtoras de antimicrobianos, foi realizada uma seleção de linhagens tipo de cada espécie de *Pseudomonas* *gacA* positiva identificada, com base no potencial antagônico destas frente a fitopatógenos. Assim foram selecionadas as linhagens 19 (*P. putida*), 24 (*P. plecoglossicida*) e 67 (*P. stutzeri*) para extração dos metabólitos e análise antimicrobiana dos extratos brutos. Adicionalmente, foram selecionadas as linhagens 27 (*P. putida* – 91,67%), 30 (*P. putida* – 94,9%), 36 (*P. putida* - 96,86%), 40 (*P. mosseli* – 94,81%) e 62 (*P. plecoglossicida* – 96,19%) identificadas com baixa similaridade com o banco de dados.

Na análise de difusão em ágar dos extratos brutos (pH 3,0 e 12,0), todas as linhagens testadas de *Pseudomonas* sp. foram efetivos contra pelo menos um dos fitopatógenos (*Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*) (Tabela 5).

Os extratos brutos, 19, 24, 27 e 40, em pH 3,0, que correspondem respectivamente as linhagens *P. putida*, *P. plecoglossicida*, *Pseudomonas* sp. e *Pseudomonas* sp. inibiram todos os fitopatógenos avaliados (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise de difusão em ágar dos extratos brutos de *Pseudomonas* sp. contra fitopatógenos

Extratos (10 mg/mL)	Fitopatógenos		
	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>
19 (pH 3,0)	+	+	+
19 (pH12,0)	+	-	-
24 (pH 3,0)	+	+	+
24 (pH 12,0)	+	-	-
27 (pH 3,0)	+	+	+
27 (pH 12,0)	+	-	+
30 (pH 3,0)	+	-	-
30 (pH 12,0)	+	+	-
36 (pH 3,0)	+	-	-
36 (pH 12,0)	+	+	-
40 (pH 3,0)	+	+	+
62 (pH 3,0)	+	-	-
62 (pH12,0)	+	-	-
67 (pH 3,0)	+	-	-

O fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani*, teve seu crescimento inibido pelos extratos brutos, em pH ácido e básico, de todas as linhagens de *Pseudomonas* sp. avaliadas (Figura 8).

Figura 8 - Teste de antibiose de extratos brutos de linhagens de *Pseudomonas* sp. contra o fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (Rs).

Ao centro, o controle do fitopatógeno.

No teste de Concentração Mínima Inibitória (CIM), os extratos brutos em pH ácido (pH 3,0) de todas as linhagens avaliadas mostraram atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (Tabela 6 e Figura 9). A mínima concentração capaz de inibir as bactérias patogênicas foi observada para o extrato bruto em pH 12,0 da linhagem 27 (Tabela 6), no entanto esta linhagem não inibiu *Staphylococcus aureus*.

O extrato bruto ácido da linhagem 62 (*Pseudomonas* sp.) apresentou a menor concentração inibitória para o patógeno *S. aureus*. Somente os extratos ácidos das linhagens 30 e 40 também inibiram esse patógeno (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentração Mínima Inibitória dos extratos brutos em pH ácido (A) e básico (B) de *Pseudomonas* spp. contra bactérias patogênicas

Patógenos	Extratos (mg.mL ⁻¹)									
	24A	24B	27A	27B	30A	30B	40A	62 ^a	62B	67A
<i>Burkholderia</i> sp.	0,29	x	1,79	0,05	x	0,55	x	0,28	x	x
<i>Enterococcus</i> sp.	0,29	x	0,45	0,09	0,63	0,55	2,00	0,46	x	2,50
<i>Escherichia coli</i>	0,14	x	1,79	0,05	x	0,14	x	0,23	x	x
<i>K. pneumoniae</i>	0,29	x	3,58	0,09	1,25	0,14	1,00	0,28	x	2,50
<i>P. aeruginosa</i>	0,07	x	0,45	0,01	x	0,28	x	0,12	x	x
<i>S. aureus</i>	x	x	x	x	2,50	x	2,00	0,55	x	x

x Sem inibição.

Figura 9 - Teste de concentração mínima inibitória do extrato bruto básico da linhagem 30 (*Pseudomonas* sp.) contra bactérias patogênicas

A) *Enterococcus* sp., B) *P. aeruginosa*, C) *Eschechia coli*, D) *Klebsiela pneumoniae*, E) *Burkholderia* sp. e F) *Staphilococcus aureus*. Concentração do extrato bruto: 1) 1,09 mg.mL⁻¹, 2) 0,55 mg.mL⁻¹, 3) 0,28 mg.mL⁻¹ e 4) 0,14 mg.mL⁻¹ concentração mínima inibitória.

2.3.3 Análise enzimática de linhagens de *Pseudomonas* spp.

Nesta análise, a atividade de linhagens de *Pseudomonas* foi testada em placas com meio de cultura contendo substrato específico para as diferentes atividades enzimáticas. Todas as linhagens de *Pseudomonas* sp. avaliadas apresentaram atividade de celulase e lipase. As linhagens 24 (*P. plecoglossicida*), 27 (*Pseudomonas* sp.) e 62 (*Pseudomonas* sp.), apresentaram melhor atividade lipolítica, sendo esta verificada pelo diâmetro do halo de degradação formado ao redor da colônia (Tabela 7).

As enzimas catalase e lacase também foram produzidas por todas as linhagens testadas. No entanto, somente a linhagem 19 (*P. putida*) produz a enzima amilase (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise enzimática de linhagens de *Pseudomonas* spp.

Linhagem/Teste	Amilase	Catalase	Celulase*	Lacase	Lipase*
19	+	+	1,7 cm	+	2,1 cm
24	-	+	2,0 cm	+	3,5 cm
27	-	+	1,3 cm	+	4,0 cm
30	-	+	1,2 cm	+	2,3 cm
36	-	+	1,2 cm	+	1,8 cm
40	-	+	1,2 cm	+	2,8 cm
62	-	+	1,4 cm	+	3,7 cm
67	-	+	1,1 cm	+	1,7 cm

* Diâmetro do halo de degradação formado ao redor da colônia

2.3.4 Estudo da estrutura da comunidade de *Pseudomonas* spp. em manguezais por DGGE

No estudo da estrutura da comunidade *Pseudomonas* spp., respostas distintas foram obtidas de acordo com o gene avaliado. Duas análises foram realizadas, uma com base no gene 16S rRNA e outra com base no gene *gacA*. Na análise de 16S rRNA, foi possível observar perfis de bandas distintos em cada um dos manguezais e pontos amostrados, enquanto que para a análise baseada no gene *gacA*, as bandas mostraram-se distribuídas de maneira aleatória entre as amostras analisadas (Figuras 10 e 11). Isto foi ainda mais evidenciado na análise de componentes principais (PCA) para tais grupos, com a separação das amostras de diferentes manguezais na análise baseada no gene ribossomal (Figura 12), e a mistura das amostras na PCA para o perfil de DGGE do gene *gacA* (Figura 13).

Por meio da análise de PCA do perfil do DGGE do 16S rRNA de *Pseudomonas* sp. podemos observar a separação das amostras do manguezal de Bertioga contaminado com óleo cru dos demais manguezais estudados, no primeiro eixo. No segundo eixo, é possível observar a separação dos manguezais de Bertioga não contaminado e Cananéia (Figura 12). A diferença entre os pontos amostrados é acentuada nos manguezais de Cananéia e Bertioga contaminado com óleo cru (Figura 12).

Figura 10 - Perfil de DGGE para *Pseudomonas* spp., baseado no gene 16S rRNA, nas diferentes amostras de sedimentos avaliadas.

M indica o marcador.

Figura 11 - Perfil de DGGE para *Pseudomonas* spp., baseado no gene *gacA*, nas diferentes amostras de sedimentos avaliadas.

M indica as linhas com marcador.

Figura 12 - Análise de componentes principais (PCA) dos perfis do DGGE de *Pseudomonas* sp baseado no gene 16S rRNA.

Os valores nos eixos indicam a porcentagem de variância total dos dados representada pelo eixo.

Figura 13 - Análise de componentes principais (PCA) dos perfis do DGGE de *Pseudomonas* sp. baseado no gene *gacA*.

Os valores nos eixos indicam a porcentagem de variância total dos dados representada pelo eixo.

A análise multivariada, RDA da matriz de bandas do DGGE para o gene 16S rRNA de *Pseudomonas* sp. com as variáveis ambientais permitiram observar efeitos significativos (Tabela 8) das características físico-químicas (tipo de solo, teor de

matéria orgânica, pH, carbono, nitrogênio e enxofre totais) dos sedimentos sobre a composição da comunidade de *Pseudomonas* sp. nos diferentes pontos e manguezais amostrados. A contaminação com óleo cru, porcentagem de umidade, salinidade e condutividade elétrica foram significativamente determinantes para as diferenças observadas na estrutura da comunidade de *Pseudomonas* sp. dos manguezais estudados (Tabela 8). O manguezal de Cananéia, apresenta níveis elevados de salinidade e condutividade elétrica nos ponto 1 e 2 (Tabela 3), assim como alto teor de argila nesta área do manguezal. A porcentagem de carbono total e nitrogênio total também são maiores no ponto 1 do manguezal de Cananéia quando comparadas aos demais pontos e manguezais analisados (Tabela 3).

Tabela 8 - Quantificação da influência das variáveis ambientais (localização inter e intra-manguezais, parâmetros físico-químicos) sobre a composição das comunidades de *Pseudomonas*, com base nos genes de 16S rRNA e *gacA*. Os valores indicam a porcentagem de variância total causada independentemente por cada fator. Variáveis significativas estatisticamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de permutação de MonteCarlo, estão em negrito e indicadas com*.

DGGE	<i>Pseudomonas</i> 16S rRNA	<i>Pseudomonas gacA</i>
Análise	RDA	CCA
Manguezal	0,22*	0,31
Bertioga Contaminado	0,24*	0,24*
Bertioga	0,17*	0,29
Cananéia	0,18*	0,37*
Localidade	0,10*	0,37*
Ponto 1	0,09*	0,39*
Ponto 2	0,08*	0,26
Ponto 3	0,10*	0,30
Contaminação	0,13*	0,03
Parâmetros físicos		
Areia	0,13*	0,04
Argila	0,15*	0,07
Silte	0,14*	0,03
Parâmetros químicos		
Matéria Orgânica (%)	0,16*	0,06
Carbono total (%)	0,14*	0,07
Nitrogênio total (%)	0,12*	0,05
Enxofre total (%)	0,17*	0,04
pH	0,17*	0,05
Umidade (%)	0,12*	0,05
Salinidade (%)	0,10*	0,05
Condutividade Elétrica	0,10*	0,05

A análise multivariada baseada no gene *gacA* revela diferença significativa do manguezal de Cananéia e de Bertioga contaminado, apenas no ponto 1 (Tabela 8). No entanto, na análise multivariada do DGGE do gene *gacA* não foi observado

nenhum efeito significativo das características dos sedimentos sobre a estrutura da comunidade de *Pseudomonas* sp. (Tabela 8).

2.3.5 Biblioteca de clones 16S rRNA de *Pseudomonas* spp. de sedimentos de manguezais

No presente estudo, um total de 96 clones foi obtido de sedimentos de manguezais e suas sequências comparadas on-line no SIMO-RDP (http://simo.marisci.uga.edu/public_db/analysis_login.asp). A afiliação filogenética das sequências resultou num total de 15 espécies de *Pseudomonas* sp. caracterizadas pelo 16S rRNA (*P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. cedrina*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. mendocina*, *P. nitroreducens*, *P. otitidis*, *P. psychrotolerans*, *P. protegens*, *P. reactans*, *P. reiekei*, *P. resinovorans*, *P. trivialis* e *P. veronii*), considerando todos os manguezais amostrados. Entre as espécies caracterizadas, *P. nitroreducens* e *P. fluorescens* foram as mais freqüentes, em todos os manguezais (Figura 14). Aproximadamente 60% dos clones, de cada manguezal amostrado, não puderam ser caracterizados em espécies pelo gene 16S rRNA (Figura 14), apresentando similaridade a bactérias não cultiváveis ou baixa similaridade a espécies cultiváveis.

A espécie *P. fluorescens* foi a única da biblioteca de clones comum as espécies acessadas por meio de isolamento. A espécie *P. putida*, isolada predominantemente de todos os manguezais, não foi observada na biblioteca de clones (Figuras 7 e 14).

A comparação das bibliotecas de clones demonstrou diferenças na composição da comunidade de *Pseudomonas* nos diferentes manguezais amostrados (NCB- Bertioga não contaminado; BC1-Bertioga contaminado Ponto 1; BC2 – Bertioga Contaminado Pontos 2 e 3; CAN – Cananéia) (Figura 14).

Clones afiliados as espécies *P. mendocina*, *P. protegens* e *P. veronii* foram exclusivos para o manguezal de Bertioga não contaminado (Figura 14). Neste manguezal, assim como em BC1 foi observada a espécie *P. otitidis*. Somente no manguezal BC1 foram obtidas sequências de clones similares a *P. trivialis* e *P. psychrotolerans*. Muitas sequências da biblioteca BC1 são afiliadas a *Pseudomonas* sp. associadas a plantas (ANEXO A). Neste manguezal e em Cananéia foram encontradas sequências similares a *P. cedrina* (Figura 14) e a

linhagens de *P. nitroreducens* tolerantes a salinidade (ANEXO A). *P. alcaligenes* compõe somente a biblioteca de clones de Cananéia (Figura 14).

Na biblioteca de clones BC2 do manguezal de Bertioga, foram observadas 3 sequências de clones exclusivas, afiliadas geneticamente às espécies *P. resinovorans*, *P. chlororaphis* e *P. reinekei* (Figura 14 e ANEXO A). Nessa biblioteca de clones, algumas sequências são afiliadas a espécies degradadoras de diferentes compostos, tais como *P. reinekei* que degrada clorosalicilatos e *P. nitroreducens*, degradadoras de triadimefon e herbicidas (ANEXO A).

Figura 14 - Diversidade de *Pseudomonas* spp. em biblioteca de clones (16S rRNA) obtidos de sedimentos de manguezais.

As siglas representam os manguezais amostrados de Bertioga não contaminado (NCB), Bertioga contaminado com óleo cru ponto 1 (BC1), Bertioga contaminado com óleo cru pontos 2 e 3 (BC2) e Cananéia (CAN).

Utilizando o programa S-Libsshuff, as sequências de clones de todas as bibliotecas foram agrupadas em 63 UTOs. A análise das bibliotecas de clones dos

manguezais demonstrou maior similaridade entre as UTOs do Ponto 1 do manguezal de Bertioga Contaminado (BC1) com as do manguezal da Ilha do Cardoso, em Cananéia (CAN). Enquanto, as UTOs dos pontos 2 e 3 de Bertioga Contaminado (BC2), foram mais similares as UTOs do manguezal de Bertioga não contaminado com óleo cru (NCB) (Figuras 15 e 16).

Figura 15 - Análise de agrupamento das UTOs das bibliotecas de clones do gene 16S rRNA de *Pseudomonas* spp. de sedimentos de manguezais.

Para a análise foi utilizado o índice Jclass, com 0,03 de distância.

O resultado do heatmap indica que as bibliotecas de diferentes manguezais apresentam UTOs bem distintas, ou seja, cada manguezal apresenta uma comunidade de *Pseudomonas* spp. característica, concordando com o resultado da análise de RDA dos perfis do DGGE para o gene 16S rRNA de *Pseudomonas* spp. (Figuras 12 e 16).

Figura 16 - Heatmap das bibliotecas de clones do gene 16S rRNA de *Pseudomonas* em sedimentos de manguezais do Estado de São Paulo.

Também foram construídos diagramas de Venn (FAUTH et al., 1996) para verificar as intersecções e peculiaridades entre os ambientes de manguezais, identificando o número de UTOs exclusivas e compartilhadas entre o manguezal de Cananéia e os manguezais de Bertioga contaminado com petróleo e o não contaminado. Nesta análise (Figura 17), foram observadas somente três UTOs comuns entre o ponto 1 (BC1) e pontos 2 e 3 (BC2) do manguezal de Bertioga Contaminado, evidenciando a diferença entre os pontos amostrados neste manguezal, conforme análise de DGGE (Figura 12). Com relação ao manguezal de Bertioga não contaminado (NCB), foram observadas 2 UTOs comuns ao Ponto 1 do manguezal de Bertioga contaminado (BC1) e 4 espécies comuns aos pontos 2 e 3 (BC2) do manguezal de Bertioga Contaminado. Quando comparada a composição de espécies do manguezal de Bertioga não contaminado (NCB) ao manguezal de Cananéia preservado (CAN), somente uma UTO é compartilhada pelos manguezais (Figura 17).

Figura 17 - Diagrama de Venn baseado nas sequências de clones dos manguezais analisados.

As siglas representam os manguezais amostrados de Bertioga não contaminado (NCB), Bertioga contaminado com óleo cru ponto 1 (BC1), Bertioga contaminado com óleo cru pontos 2 e 3 (BC2) e Cananéia (CAN).

Entre o manguezal de Cananéia e o de Bertioga contaminado ponto 1 (BC1) houve o maior número de UTOs compartilhadas (6). Já em relação aos pontos 2 e 3

do manguezal de Bertioga, que apresentam maior contaminação, somente duas UTOs são comuns ao manguezal de Cananéia (Figura 17).

O manguezal de Bertioga não contaminado apresentou 15 sequências de clones exclusivas. Para os demais manguezais, foram observadas 13 sequências de clones exclusivas em cada (Figura 17). A riqueza total para os manguezais foi de 63.

2.4 DISCUSSÃO

O gênero *Pseudomonas* é um grupo que desempenha funções importantes em ecossistemas agrícolas, está envolvido na supressão de doenças em muitas culturas (LEMANCEAU; ALABOUVETTE, 1991; MENDES et al., 2011), e na promoção de crescimento de plantas (SHARMA et al., 2003). No entanto, existe pouca informação sobre os fatores ambientais e antropogênicos que determinam ou influenciam a ocorrência, a distribuição e a atividade de populações de *Pseudomonas* no solo (LATOUR et al., 1996), e principalmente em ambientes extremos como os manguezais.

As *Pseudomonas* produzem uma gama de metabólitos secundários com atividade antifúngica. Na maioria das linhagens de *Pseudomonas*, a síntese desses metabólitos de interesse é controlada por um sistema de dois componentes, a quinase sensorial GacS e o regulador global de resposta GacA (KITTEEN et al., 1998). No presente estudo, o gene *gacA* (regulador global da síntese de antibióticos e enzimas extracelulares) foi utilizado como alvo para bioprospecção e estudo da ecologia deste grupo.

A presença do gene *gacA* foi verificada em 66,27% das linhagens obtidas por isolamento seletivo para *Pseudomonas* de amostras de sedimento de manguezais. O gene *gacA* é muito conservado no gênero *Pseudomonas* sp. (de Souza et al., 2003). As linhagens de *Pseudomonas* selecionadas com base nesse gene funcional, não puderam ser identificadas pelas sequências do gene *gacA* amplificado, em função da baixa similaridade com o banco de dados do NCBI (Tabela 4). Dessa forma, sequências do gene 16S rRNA foram utilizadas para a caracterização molecular dos isolados.

Em análise utilizando o gene 16S rRNA, dois organismos podem ser considerados do mesmo gênero se a identidade entre eles for superior a 95%

(LUDWIG et al., 1998) e da mesma espécie se for superior a 97,5% (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Assim, após análise das sequências do 16S rRNA de *Pseudomonas* selecionadas, somente 18 linhagens puderam ser caracterizadas em espécie, pois apresentaram mais de 97,5% de similaridade com o banco de dados do RDP e outras 22 puderam ser caracterizadas no gênero *Pseudomonas* sp. Quanto às demais linhagens, podemos supor que pertençam a espécies ainda não descritas. Estas linhagens foram denominadas não classificadas (Figura 7).

A utilização do FAMES permitiu a caracterização de mais 11 linhagens de *Pseudomonas* sp (Tabela 4). A linhagem 73, caracterizada pelo gene 16S rRNA como *P. fulva* (96,98%), foi identificada com índice de similaridade satisfatório pelo FAMES como *P. putida* (0,557) (Tabela 4), no entanto, a espécie *P. fulva* possui os maiores ácidos graxos celulares C16 : 0, C16 : 1 e C18 : 1 (IKEMOTO et al., 1978; OYAIKU; KOMAGATA, 1983), que não podem ser discriminados pelo cromatógrafo gasoso utilizado na análise de FAMES, apesar do aparelho detectá-los como *summed feature* (Figura 6). A *P. fulva*, não consta na biblioteca atualizada TSBA 60 do FAMES, sendo assim, não é possível classificar a linhagem 73 como *P. putida*. Essa divergência taxômica entre os métodos utilizados para a caracterização dos isolados pode estar relacionada ao fato das espécies *P. putida* e *P. fulva* pertencerem ao mesmo ramo evolutivo (Figura 1), dificultando a sua caracterização.

Uma das maiores dificuldades para estudar as comunidades do solo é a imensa diversidade genotípica e fenotípica de bactérias e fungos do solo (OVREAS et al., 1998). Segundo Rondon et al. (1999), é possível que 1% das bactérias cultiváveis representem a população inteira e os outros 99% se encontrem num estado fisiológico que iludam nossa capacidade de cultivá-los. No entanto, também é provável que os outros 99% são genotipicamente e fenotipicamente diferentes dos 1% cultivados, sendo assim, uma minoria da população esta sendo representada (RONDON et al., 1999, 2000).

A riqueza e abundância de espécies de *Pseudomonas* spp. isoladas de sedimentos de manguezais do estado de São Paulo não corresponde a diversidade de *Pseudomonas* spp. observada na biblioteca de clones de sedimentos de manguezais. Neste estudo, foi observada uma alta frequência de isolados afiliados a espécie *P. putida*, em todos os manguezais avaliados (Figura 7), no entanto, esta espécie não foi acessada na biblioteca de clones de 16S rRNA (Figura 14). Vários

estudos sobre bactérias de solo relatam que apesar da prevalência de *Pseudomonas* no cultivo, normalmente estas espécies não são recuperadas em bibliotecas de clones de 16S rRNA (BORNEMAN et al. 1996; BORNEMAN; TRIPLETT 1997; FELSKE et al. 1997; FELSKE et al. 1998; MACRAE et al., 2000). No presente estudo, a diferença de diversidade de bactérias observada entre as técnicas de estudo ocorre dentro o gênero das *Pseudomonas*, demonstrando que a espécie mais frequentemente isolada, *P. putida*, não é predominante no ambiente de sedimentos de manguezais, pois não foi recuperada na biblioteca de clones. Assim, podemos sugerir que a *P. putida* foi predominantemente cultivada devido ao metabolismo versátil desta espécie, rápido crescimento em meio de cultivo e potencial competitivo da bactéria.

Entre as espécies de *Pseudomonas* sp. isoladas neste estudo, algumas apresentam potencial de biodegradação e biorremediação relatados. A espécie *P. plecoglossicida*, foi primeiramente descrita por Nishimori et al. (2000), tendo sido isolada de um peixe (*Plecoglossus altivelis*) com ascite hemorrágica bacteriana, sendo o agente causal da doença. Boricha e Fulekar (2009) relatam o potencial dessa espécie bacteriana para a biorremediação do pesticida cipermetrina (tóxico a peixes). Em sedimento de manguezal de uma reserva natural de Hong Kong, foi isolada uma *Pseudomonas fluorescens* B-1 capaz de degradar n-Butyl benzil phthalato (BBP). Os autores deste estudo sugerem que o ambiente de manguezal possibilita a mineralização do BBP (XU et al., 2007).

Com relação à *Pseudomonas fulva*, esta espécie é encontrada em diversos ambientes (OYAIZU; KOMAGATA, 1983), sendo ecologicamente relacionadas às espécies *P. straminea*, *P. oryzae*, *P. fluorescens* e *P. graminis* em função de se associarem a plantas e produzirem pigmentos fluorescentes insolúveis em água.

As espécies *P. fluorescens* e *P. putida* isoladas neste estudo, são conhecidas pelo seu potencial para promoção de crescimento de plantas (van LOON et al., 1998; PIETERSE; van LOON, 1999). *P. fluorescens* também produz metabólitos secundários como 2,4 diacetilfluoroglucinol, pirrolnitrina, pioluterina, ácido cianídrico e fenazina e tem sido explorada como potencial agente de biocontrole para vários patógenos de solo (LAVILLE et al., 1992; MULYA et al., 1996). Outras espécies de *Pseudomonas* spp. acessadas neste estudo também são descritas como agentes de biocontrole. Estudos com bactérias do manguezal de Bertioga contaminado relatam o potencial da espécie *P. stutzeri*, para produção de biossurfactante eficiente no

biocontrole de *Pythium aphanidermatum* em hidropônia (CORRÊA et al., 2011). A *P. syringae*, isolada exclusivamente do manguezal de Bertioga contaminado com óleo cru (Figura 7), é uma bactéria patogênica a plantas, no entanto também pode ser agente de controle de doenças de plantas, como relatado por Myers e Strobel (1983), esta espécie é antagônica ao fungo fitopatogênico *Ceratocystis ulmi*.

A diversidade genética entre as linhagens de *Pseudomonas gacA* positivas fornece um enorme recurso para identificação de linhagens que são altamente competentes para o controle biológico de doenças de plantas. O gênero *Pseudomonas* é bem conhecido pelo seu potencial para biocontrole de patógenos de solo. A produção de antibióticos é importante para a eficiência dessas bactérias no controle de fitopatógenos (DOWLING et al., 1994; ELLIS et al., 1999). Melo e Azevedo (2000) descrevem *P. putida* e *P. fluorescens* como antagonistas a espécies de *Pythium* sp. e *Rhizoctonia* sp.

Em análise do potencial de linhagens de *Pseudomonas* sp. *gacA* positivas para produção de antimicrobianos, foi verificado que os extratos brutos das linhagens 19, 24, 27 e 40, foram capazes de inibir todos os fitopatógenos testados (Tabela 5), demonstrando produzir antifúngicos de amplo espectro. Kumar et al. (2005), também relatam em seus estudos a produção de um antifúngico de amplo espectro por uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3, sendo o metabólito ativo identificado como piocianina (PCN), com potencial de ser utilizado para o controle biológico contra vários fitopatógenos. A linhagem *P. fluorescens* CHAO também apresenta atividade de biocontrole de amplo espectro (KEEL; DÉFAGO, 1992).

Os resultados dos testes de antibiose (Tabela 5) demonstram o potencial das linhagens de *Pseudomonas* sp. avaliadas para controle de doenças de plantas causadas por *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Estudos relatam a importância deste gênero bacteriano para o controle de doenças de plantas. Georgakopoulos et al. (2002), utilizou isolados de *Pseudomonas* spp. para controle de tombamento (*damping-off*) causado por *Pythium* sp. em culturas de pepino e beterraba. Produtos biológicos a base de *Pseudomonas aureofaciens* (BioJect e Spot-Less) são importantes no controle dos fitopatógenos *Pythium aphanidermatum* e *Colletotrichum* sp. (MARIANO et al., 2004).

O gênero *Pseudomonas* também tem demonstrado importância na área médica, tanto como patógeno humano, como também produtor de antibióticos. No

presente estudo, as linhagens de *Pseudomonas* spp. avaliadas demonstraram capacidade de inibição de bactérias patogênicas Gram positivas e Gram negativas, incluindo bactérias resistentes a múltiplas drogas, como *Staphylococcus aureus* (Tabela 6). Outro estudo mostra que *Pseudomonas* marinhas também produzem metabólitos antibióticos capazes de inibir bactérias Gram negativas e Gram positivas (NAIR; SIMIDU, 1987).

Todas as linhagens de *Pseudomonas* spp. avaliadas neste estudo possuem o gene *gacA*, sugerindo que a produção dos metabólitos que apresentaram atividade contra fungos e bactérias seja regulada por este gene. Sabendo que o gene *gacA* também regula a expressão de enzimas extracelulares (HEEB; HAAS, 2001), podemos correlacionar a produção das enzimas celulase e lipase pela expressão desse gene nas linhagens avaliadas neste estudo (Tabela 7).

A enzima celulase é capaz de degradar a parede celular de fitopatógenos, sendo assim, as linhagens de *Pseudomonas* sp. avaliadas neste estudo (Tabela 7) apresentam potencial para inibição de fitopatógenos de parede celulósica, como os oomicetos *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae*, *Phytophthora cinnamomi* e *Pythium* sp. (HARDHAM, 2007). A atividade celulolítica vem sendo relatada para espécies de *Pseudomonas* fluorescentes (FRIDLENDER et al., 1993), mas poucos trabalhos reconhecem seu papel como potencial enzima antifúngica no controle de doenças de plantas (SINDHU; DADARWAL, 2001).

Segundo Kordel et al. (1991), o gênero *Pseudomonas*, se destaca entre as bactérias para a produção da enzima lipase, sendo verificado no presente estudo, que esta é produzida por diferentes espécies de *Pseudomonas* sp., no entanto, as linhagens 24 (*P. plecoglossicida*), 30 e 62 (*Pseudomonas* sp.) apresentaram maior atividade lipolítica (Tabela 7). Vasconcellos (2006) relata altos níveis de produção das enzimas esterases e lipases por diversas espécies do gênero *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Halomonas* isoladas de enriquecimento de petróleo.

A enzima catalase foi produzida por todas as linhagens testadas (Tabela 7), conforme o esperado, pois características como células Gram negativas e catalase sempre positiva são um dos requisitos para a identificação do gênero *Pseudomonas* (MADIGAN et al., 2000). A atividade de lacase também foi observada para todas as linhagens de *Pseudomonas* sp. (Tabela 7). Estas enzimas são biocatalisadores conhecidos na transformação de compostos fenólicos ou aminas aromáticas e são consideradas uma das enzimas mais promissoras para aplicações industriais (XU,

2005). As lacases estão envolvidas na degradação de complexos polímeros naturais, como a lignina (DEAN; ERIKSSON, 1994, THURSTON, 1994) ou ácidos húmicos (CLAUS; FILIP 1998). Lacases de *Pseudomonas stutzeri* tem sido avaliadas para o descoloramento de polpas *kraft* de eucaliptus (KUMAR et al., 2005).

Entre as linhagens de *Pseudomonas* sp. avaliadas, somente a *P. putida* (linhagem 19) produziu a enzima amilase (Tabela 7). Liu et al. (2011) recentemente isolaram e caracterizaram uma α -amilase de uma *Pseudomonas* sp. marinha. As amilases hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose. Estas enzimas apresentam grande importância em biotecnologia com aplicações desde alimentos, fermentação, têxtil e nas indústrias de papel (GUPTA et al., 2003).

As técnicas dependentes de cultivo utilizadas neste estudo foram importantes para a caracterização e determinação do potencial biotecnológico de *Pseudomonas* de sedimentos de manguezais. A maioria dos estudos nas comunidades de *Pseudomonas* do solo utiliza técnicas dependentes de cultivo (LATOUR et al., 1996; ACHOUAK et al., 2000; RANGARAJAN et al., 2001). Segundo Torsvik et al. (1998), aproximadamente 1% da população bacteriana do solo pode ser cultivada pelas práticas padrões de laboratório. Embora o cultivo seletivo de *Pseudomonas* ter sido aplicado com sucesso, simplesmente uma pequena fração da comunidade de *Pseudomonas* de sedimentos dos manguezais pode ser recuperado pelo cultivo (Tabela 4). A importância agrônômica e a natureza saprofítica das *Pseudomonas* spp. faz esse grupo microbiano importante para a investigação independente de cultivo em ambientes de manguezais.

As técnicas independentes de cultivo são importantes, pois permitem inferir sobre o comportamento e ecologia dos micro-organismos em seu ambiente de origem. Os resultados da análise de DGGE demonstram que a comunidade de *Pseudomonas*, quando estudada com base no gene 16S rRNA, difere em todos os manguezais e pontos amostrados, mostrando a alta responsividade deste grupo de bactérias a alterações ambientais (Tabela 8), principalmente por influência da contaminação com óleo cru, salinidade e outras características físicas do sedimento. Na proximidade do mar (ponto 1 de coleta) no manguezal de Cananéia, estudos demonstram que a salinidade consiste em um fator indireto na variabilidade da

comunidade bacteriana, pois existem muitos micro-organismos adaptados as condições desse ambiente. Já no ponto 3, que apresenta o menor índice salino (COELHO-JR, 2003), Dias (2008) relata grande relação com a composição da comunidade bacteriana. No entanto, aqui observamos que para o gênero *Pseudomonas*, a diferença de salinidade na transição entre pontos (Tabela 3) é determinante para a diferença observada na estrutura e composição dessa comunidade, especialmente para o ponto 1 com relação aos demais pontos, tanto no manguezal de Cananéia, como também em Bertioga, conforme análises do DGGE (Figura 12 e Tabela 8).

Ikenaga et al. (2010) também verificaram mudanças na estrutura da comunidade bacteriana de manguezal, por meio da técnica de DGGE, de acordo com os locais amostrados (pântano de água doce, floresta dos manguezais, Baía central-oriental da Flórida, baía ocidental da Flórida). Conforme resultado da análise de correspondência canônica, os autores observaram influência da inclinação dessas áreas sobre a composição dessas comunidades, sugerindo efeito da salinidade e fósforo total. Zhang et al. (2009), também apontam correlação de fatores ambientais, como pH, teor de matéria orgânica e fósforo com variações na composição de comunidades bacterianas de diferentes áreas de manguezais.

Outros estudos relatam que em ambiente de estuário, ao longo de um gradiente entre sedimento e águas oceânicas, as comunidades bacterianas variam pela limitação de nutrientes orgânicos e inorgânicos disponíveis (ZEHR et al., 2002; SMITH et al., 2003) corroborando resultados obtidos, especialmente para o manguezal de Cananéia, onde as porcentagens de carbono total, nitrogênio total e enxofre total são significativamente superiores no ponto 1 (Tabela 3 e Tabela 8).

Diferenças entre as comunidades de *Pseudomonas* para os diferentes manguezais amostrados neste estudo, com base no gene 16S rRNA (Figuras 10 e 12), também estão relacionadas a contaminação com óleo cru do manguezal de Bertioga (Tabela 8), que pode ter estimulado e selecionado espécies degradadoras, alterando assim a estrutura e composição dessa comunidade bacteriana, com potencial reconhecido para a degradação de hidrocarbonetos (REYES, 2009; TELKE et al., 2009). Na biblioteca BC2, onde há maior contaminação com óleo cru, foram encontradas sequências afiliadas a espécies de *Pseudomonas* spp. degradadoras de diferentes compostos (ANEXO A). No Brasil, um estudo realizado em ambiente de manguezal contaminado com petróleo, as estruturas de comunidades de

bactérias variaram de acordo com a contaminação (CURY, 2002; TAKETANI et al., 2010). Em outro estudo, em enriquecimento de amostras de sedimento superficial de manguezal com diferentes compostos HPAs como fonte de carbono, foi demonstrado pela técnica de DGGE, mudanças complexas na dinâmica da comunidade bacteriana sob pressão seletiva representada pela presença de compostos HPAs de 3 à 5 anéis (TIAN et al., 2008). Segundo Zhou et al. (2009), o tempo de exposição e a concentração de HPA reduzem a diversidade microbiana. Os HPAs poderiam ser fonte de carbono para determinados grupos microbianos, como as *Pseudomonas*, no entanto os autores verificaram que mesmo em pequenas concentrações (20 mg.ml⁻¹), esses compostos são tóxicos para a comunidade microbiana.

Na análise de DGGE para o gene *gacA*, envolvido na síntese de antibióticos e enzimas extracelulares, as bandas encontram-se distribuídas de maneira aleatória (Figura 11), não ocorrendo separação das amostras na PCA (Figura 13), diferente do observado para a análise do DGGE para o gene 16S rRNA. Dessa forma, podemos sugerir a seleção de *Pseudomonas* spp. em manguezais pelas condições ambientais e não pelo potencial competitivo conferido pela produção de antibióticos.

Costa et al. (2007) observaram por meio do DGGE do gene *gacA* que a composição de *Pseudomonas* na rizosfera é específica para cada espécie de planta, com grupos definidos para a rizosfera de morangueiro e outros para a rizosfera de canola e ainda que a riqueza de espécies é superior aquela observada para o solo. Outro estudo com base no gene *gacA*, verificou alterações no perfil da comunidade de *Pseudomonas* da rizosfera quando expostas ao protozoário *Amoebae*, (ROSENBERG et al., 2009). No entanto, no presente estudo, a biota dos diferentes manguezais amostrados não induz nenhuma alteração significativa na comunidade de *Pseudomonas* de sedimentos, considerando o gene funcional *gacA*, regulador da síntese de antibióticos (Figura 11 e 13). Este foi o primeiro estudo da estrutura e composição da comunidade de *Pseudomonas* produtoras de antibióticos (*gacA* positivas) em manguezais.

A correlação das variáveis ambientais com a matriz de bandas do DGGE do gene *gacA* pela análise de correspondência canônica, revelou diferença, até então não demonstradas pela análise do gel e pela PCA, na comunidade de *Pseudomonas* sp. do manguezal de Cananéia e de Bertioga Contaminado, mais especificamente do ponto 1 (Tabela 8). Para o manguezal de Cananéia, estes resultados podem

estar relacionados a resposta ao estresse reconhecida para o gene *gacA* (WHISTLER et al., 1998). Maiores porcentagens de salinidade são verificadas no ponto 1 do manguezal de Cananéia (Tabela 3), no entanto, nenhuma diferença significativa foi observada em relação aos fatores físico-químicos dos sedimentos, nem mesmo com relação a condutividade elétrica e salinidade do sedimento para o DGGE do gene *gacA* (Tabela 8). Com relação a diferença observada para o manguezal de Bertioga contaminado, podemos sugerir a regulação de enzimas pelo gene *gacA* para degradação do óleo cru (hidrocarbonetos), e consequentemente seleção de espécies de *Pseudomonas* sp. com esse potencial, como também evidenciado pela análise do gene 16S rRNA (Tabela 8). No presente estudo, foi demonstrado o potencial de linhagens de *Pseudomonas* sp. para a produção da enzima lacase, Telke et al. (2009) relata a importância dessa enzima para degradação de poluentes orgânicos. Reyes (2009) isolou do manguezal de Bertioga contaminado uma linhagem de *P. stutzeri* altamente eficiente para degradação de hidrocarbonetos.

O estudo da composição e diversidade da comunidade de *Pseudomonas* spp. de sedimentos de manguezais também foi realizado por meio da construção de bibliotecas de clones. O conhecimento da diversidade bioquímica e fisiológica de micro-organismos vem de estudos com menos de 1% dos micro-organismos existentes, ou seja, aqueles que podem ser cultivados. Enquanto o conhecimento da diversidade filogenética provém da aplicação de técnicas moleculares, que por sua vez são limitadas em termos de identificação de membros com baixa abundância nas comunidades (RUSCH et al., 2007). No presente estudo, 60% dos clones de *Pseudomonas* spp. não puderam ser caracterizados em espécies, apresentando em sua maioria, similaridade a sequências de bactérias não cultivadas, confirmando que a maioria dos micro-organismos existentes ainda não podem ser cultivados.

A análise das sequências de clones demonstra diferenças na composição da comunidade de *Pseudomonas* das bibliotecas de clones dos diferentes manguezais amostrados (NCB-Bertioga não contaminado; BC1-Bertioga contaminado; BC2-Bertioga Contaminado Pontos 2 e 3; CAN- Cananéia), demonstrando que o ambiente seleciona a comunidade de *Pseudomonas* spp. Essa diferença nas bibliotecas de clones para manguezais distintos é evidência da no heatmap, onde poucas UTOs são compartilhadas entre as bibliotecas (Figuras 14 e 16). Conforme análise de RDA do DGGE para o 16S rRNA de *Pseudomonas* (Tabela 8), estas

variações na composição da comunidade de *Pseudomonas* entre manguezais estão relacionadas as interferências e particularidades dos fatores ambientais de cada manguezal, especialmente fatores físico-químicos dos sedimentos (Tabela 3) e contaminação com óleo cru.

A análise do agrupamento das UTOs das bibliotecas de clones do gene 16S rRNA de *Pseudomonas* sp. demonstrou maior similaridade entre as UTOs do Ponto 1 do manguezal de Bertioga Contaminado (BC1) com as do manguezal da Ilha do Cardoso (Figuras 15 e 16). Enquanto as UTOs dos pontos 2 e 3 de Bertioga contaminado (BC2) foram mais similares as UTOs do manguezal de Bertioga não contaminado com óleo cru (NCB). Os sedimentos dos manguezais de Bertioga Ponto 1 (BC1) e Cananéia são classificados como Entisols (solos pouco desenvolvidos), enquanto os sedimentos de áreas próximas a floresta (NCB e BC2) em Bertioga, são classificados como Histosols (RIGONATO, 2010), ou seja solos com elevado acúmulo de matéria orgânica, provavelmente por acúmulo de petróleo no caso de Bertioga (BC2). Quando comparamos o tipo de sedimento com o agrupamento das bibliotecas de clones de *Pseudomonas* em sedimentos de manguezais (Figura 15), observamos uma relação direta entre a característica do sedimento e a composição da comunidade *Pseudomonas* spp. aí presente.

O resultado das análises das bibliotecas de clones (Figuras 14 a 16) reforça a hipótese do efeito da contaminação com petróleo, ocorrida em Bertioga há 20 anos, na alteração da composição da comunidade de *Pseudomonas* spp. em relação as áreas de manguezais não impactados. Peixoto et al. (2011) relata que o nível de hidrocarbonetos de petróleo totais é significativamente associado ao perfil de *Bacteria* e *Betaproteobacteria*, enquanto antraceno e hidrocarbonetos policíclicos totais estão associados ao perfil de *Actinobacteria*, em manguezal brasileiro localizado na Baía de Todos os Santos, na Bahia.

As diferenças impostas pelas características físico-químicas (salinidade e conteúdo de matéria orgânica) dos sedimentos de manguezais de áreas mais sujeitas a inundações (manguezal de Cananéia e o ponto 1 de Bertioga contaminado) também são determinantes na composição das comunidades de *Pseudomonas* spp, conforme demonstrado pela análise do DGGE (Tabela 8). Na biblioteca de clones do manguezal de Cananéia e Bertioga contaminado ponto 1, foram obtidos clones (CAN 1.20 e BC1.14) afiliados a *P. nitroreducens* tolerante a salinidade (ANEXO A), reforçando a hipótese de seleção da comunidade pelas

condições impostas pelo ambiente. Outros estudos recentes também apontam para efeito da salinidade e influência das máres na determinação da composição de comunidades de bactérias (GONZALES-ACOSTA et al., 2006; HENRIQUES et al., 2006; DIAS et al., 2010) e cianobactérias (RIGONATO, 2010) em manguezais.

A biblioteca de clones do manguezal de Bertioga contaminado ponto 1 apresenta muitas sequências similares a *Pseudomonas* sp. associadas a plantas. Essas bactérias provavelmente tem uma importante função na disponibilização de nutrientes para as espécies vegetais do manguezal. Estudos tem revelado o potencial de bactérias de manguezais para disponibilização de nutrientes e promoção do crescimento de plantas (HOLGUIN et al., 1992; HOLGUIN et al., 1999; VAZQUEZ et al., 2000; ROJAS et al., 2001; RAVIKUMAR et al., 2002, GOTTARDO, 2009). Rojas et al. (2001) observou a promoção de crescimento de mangue negro pela ação conjunta de uma bactéria fixadora de nitrogênio (*Phyllobacterium* sp.) e outra solubilizadora de fosfato (*Bacillus licheniformis*), isoladas de manguezais. No capítulo 3 do presente estudo, o potencial de promoção de crescimento de plantas é demonstrado para *Pseudomonas* isoladas de sedimentos de manguezais.

Conforme observado no diagrama de Venn (Figura 17), as bibliotecas de clones do sedimento de Bertioga contaminado Ponto 1 e do sedimento de Cananéia, compartilham o maior número de sequências de clones, sugerindo que a contaminação por petróleo pode não ser o fator determinante na composição dessa comunidade bacteriana e sim as características químicas e físicas dos sedimentos de manguezais.

De modo geral, os métodos dependentes e independentes de cultivo utilizados neste estudo demonstraram diferenças na composição da comunidade de *Pseudomonas* spp. entre os diferentes manguezais estudados. De acordo com o método utilizado, grupos diferentes de *Pseudomonas* spp. foram acessados. A abordagem dependente de cultivo, como forma de selecionar *Pseudomonas* spp. com potencial biotecnológico, pela detecção do gene *gacA*, foi eficiente. O métodos independentes de cultivo permitiram observar a modulação da estrutura e composição das comunidades de *Pseudomonas* spp. de sedimentos de manguezais pelos fatores ambientais, revelando efeitos de ações antrópicas nesse ecossistema sobre os micro-organismos estudados.

CAPÍTULO 3 - POTENCIAL DE *Pseudomonas* spp. DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAIS PARA USO COMO BIOFERTILIZANTES EM SOLOS SALINOS

3.1 INTRODUÇÃO

Comunidades de manguezais são reconhecidas como ecossistemas altamente produtivos que fornecem grandes quantidades de matéria orgânica as águas litorâneas adjacentes (HOLGUIN et al., 2001; LUGOMELA; BERGMAN, 2002). Este ecossistema é caracterizado por inundações periódicas das marés, com variações na salinidade e disponibilidade de nutrientes, selecionando assim os organismos aí presentes. Bactérias de sedimentos de manguezais são capazes de tolerar altas concentrações de sais, elas podem crescer em elevados níveis de estresse osmótico por sua capacidade de se adaptar a alterações ambientais. As mudanças adaptativas podem estar relacionadas ao acúmulo de compostos conhecidos como osmoprotetores (prolina, glicina, betaína, trealose) ou cátions (K^+ , Ca^{++}), para atingir o balanço osmótico nesse ambiente (Le RUDULIER et al., 1984).

Os manguezais são ambientes pobres em nitrogênio e fósforo e é perfeitamente possível o envolvimento das bactérias na ciclagem desses elementos. Espécies de *Pseudomonas* são conhecidas por sua versatilidade nutricional e plasticidade genética, o que permite a estas bactérias habitar ambientes extremos como os manguezais.

A mobilização de nutrientes é reconhecida para espécies do gênero *Pseudomonas*, mecanismo pelo qual essas bactérias podem promover o crescimento vegetal. O fosfato é o segundo nutriente limitante para o crescimento da planta, após o nitrogênio, e mesmo que haja fosfato total abundante na maioria dos solos agrícolas, ele está predominantemente na forma em que as plantas são incapazes de utilizá-lo, incluindo o fosfato inorgânico insolúvel precipitado e formas orgânicas do fosfato tais como o fitato. Sendo assim, bactérias capazes de solubilizar o fosfato podem ser utilizadas em culturas agrícolas, promovendo o desenvolvimento das plantas.

Pseudomonas também podem promover o crescimento de plantas por meios de outros mecanismos além da mobilização de nutrientes, como pela produção de hormônios de crescimento vegetal (ácido indol acético – AIA), podem aumentar o crescimento da raiz (De LEIJ et al., 2002), ou por meio do controle de fitopatógenos,

induzindo a resistência sistêmica da planta e/ou produzindo antibióticos contra fungos patogênicos (LUGTENBERG et al., 2002). Assim, *Pseudomonas* com estas características podem ser utilizadas para o biocontrole, como biofertilizantes e como fitoestimulantes.

Dessa forma, no presente estudo foi avaliado o potencial de linhagens de *Pseudomonas* isoladas de sedimentos de manguezais para promoção de crescimento de milho e a capacidade de tolerância a estresse salino dessas linhagens bacterianas e de plantas de milho tratadas com essas bactérias, com a finalidade de selecionar bactérias para uso como biofertilizantes em solos agrícolas salinos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Isolamento de *Pseudomonas* sp. de sedimento de manguezal

O isolamento de *Pseudomonas* de amostras de sedimento do manguezal de Cananéia foi realizado pelo método de diluição em placas, visando bactérias tolerantes a ambientes salinos para uso agrícola. Após a coleta, 2g de sedimento de cada amostra (mistura de 3 amostragens por ponto) foram processadas para a diluição seriada fator 10, conforme metodologia descrita no item 2.2.2.1.

Para o isolamento de *Pseudomonas*, alíquotas de 100 µL de cada diluição da suspensão de sedimento foram semeadas em triplicata, em placas de petri contendo meio KB (KING et al., 1954), acrescido de 2% de NaCl e modificado para seleção de *Pseudomonas* fluorescentes (King B suplementado com: 0,1 g.L⁻¹ de ciclohexamida; 0,05 g.L⁻¹ de ampicilina; 12,5 mg.L⁻¹ de cloranfenicol e 5 mg.L⁻¹ de PCNB - Kobutol), sendo então incubadas a 28 °C por 8 dias. Após o crescimento bacteriano, as colônias bacterianas foram selecionadas ao acaso, purificadas e preservadas no mesmo meio de isolamento (TUIE, 1969).

3.2.2 Caracterização fisiológica de tolerância à salinidade

Para a caracterização fisiológica de tolerância a salinidade os isolados foram crescidos em meio TSBA suplementado com diferentes concentrações de NaCl:

0,17M (1%); 0,5M (2,9%); 1,0M (5,8%); 3,0M (17,6%) e 5,0 M (29,4%). A avaliação do crescimento foi realizada diariamente até o sétimo dia de incubação.

3.2.3 Avaliação *in vitro* do potencial de linhagens de *Pseudomonas* para uso como biofertilizantes

3.2.3.1 Produção da enzima aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase

A atividade ACC deaminase foi determinada conforme descrito por Glick (1995) em meio que contém (por litro): 1g K₂HPO₄, 0,2g MgSO₄ 7H₂O, 0,1g FeSO₄ 7H₂O, 1g CaCO₃, 0,2g NaCl, 5mg NaMoO₄ 2H₂O, 10g glicose e 15g ágar. Após autoclavado, foi adicionado ao meio 0,3g.L⁻¹ de ACC filtrado. Como controle foi utilizado o meio sem ACC. As bactérias foram repicadas em cada um dos meios e depois do crescimento, transferidas para o mesmo meio em triplicata para confirmação do resultado. A observação do crescimento foi realizada após dois dias de incubação a 28°C.

3.2.3.2 Produção de ácido indol acético (AIA)

Os níveis de AIA secretados pelas bactérias no meio de cultura foram estimadas por método colorimétrico (RADWAN et al., 2005), após o cultivo em meio líquido TSB 10% (Trypticase Soy Agar) suplementado com 5mM de L-triptofano. As culturas foram mantidas a 28°C, no escuro, sob agitação constante durante 24 horas. Após esse período, foram centrifugadas a 6.000 xg durante 5 minutos, para obtenção do sobrenadante. A quantidade de AIA por ml de cultura foi estimada por meio da mistura do reagente de Salkowski (EHMANN, 1977) com 700 µL do sobrenadante da cultura (1:1), sendo realizada a leitura da absorbância a 530 nm, após 30 minutos. A concentração de AIA no meio de cultura foi determinada em comparação com a curva padrão.

3.2.3.3 Fixação de nitrogênio

As linhagens de *Pseudomonas* foram avaliadas quanto à capacidade de fixar N₂ através do crescimento em meio de cultura sem fonte de nitrogênio. As bactérias foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura semi-

sólido NFb (DÖBEREINER et al., 1995), sendo incubadas por 7 dias a 28°C. O resultado positivo foi caracterizado pela presença de um halo de crescimento no interior do meio de cultura e pela mudança de cor do meio para azul, o que indica a fixação de nitrogênio. Para confirmação dos resultados as bactérias foram repicadas para novos tubos com NFb e novamente avaliadas.

3.2.3.4 Determinação qualitativa e quantitativa da solubilização de fosfato

A seleção de linhagens de *Pseudomonas* capazes de solubilizar fosfato *in vitro* foi realizada com o uso do meio de cultura sólido NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium*) (NAUTIYAL, 1999), contendo: 10g.L⁻¹ de glicose, 5 g.L⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂, 5 g.L⁻¹ de MgCl₂. 7 H₂O, 0,25g de MgSO₄, 0,2 g.L⁻¹ de KCl e 0,1 g.L⁻¹ de (NH₄)₂ SO₄, suplementado com 1,5% de ágar. Após o período de incubação de 14 dias a 28 °C efetuou-se a observação da presença de halo, indicativo da solubilização de fosfato.

Para quantificação da solubilização de fosfato de cálcio, utilizou-se o método colorimétrico descrito por Nautiyal (1999), com algumas modificações. Foram adicionados 100 µL da suspensão bacteriana (10⁸ células. mL⁻¹ de culturas com 24 horas de crescimento) de cada isolado a tubos com 10 mL meio de cultura líquido NBRIP (pH 7,0). Após 14 dias de incubação a 28 °C, sob agitação constante, 1 mL das culturas das bactérias foram centrifugadas a 9500 x g durante 5 minutos, para obtenção do sobrenadante. Em *ependorfs*, adicionaram-se 145 µL do sobrenadante da cultura de cada bactéria, 570 µL de água deionizada e 285 µL do reagente vanado-molibídico (MALAVOLTA et al., 1989). A curva padrão foi construída pelo preparo da solução estoque de KH₂PO₄ e H₂SO₄ (10N) dissolvidos em água. A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro (modelo UV-1601 PC, Shimadzu) a 420 nm, 10 minutos após a adição do reativo colorido.

3.2.3.5 Produção de amônia (NH₃)

As bactérias foram inoculadas em 10 mL de água peptonada (1% peptona; 0,5% NaCl; pH 7,0) e incubadas por 48 h a 28 °C. Após incubação foram adicionados 500 µL do reagente de Nessler (10% Hgl₂; 7% KI; 50% solução aquosa NaOH a 32%). A técnica é baseada na detecção da presença de N amoniacal, onde

é formado um precipitado amarelo-acastanhado e quanto maior a concentração, mais intensa a coloração.

3.2.3.6 Produção de cianeto de hidrogênio (HCN)

As linhagens de *Pseudomonas* sp. foram testadas para a habilidade de produzir cianeto de hidrogênio (HCN). Para este estudo, as bactérias foram estriadas isoladamente em meio TSA (10%) adicionado de 4,4 g.L⁻¹ de glicina e 0,3 mM de FeCl₃.6H₂O. As placas foram invertidas e em cada tampa foi colocado papel filtro autoclavado impregnado com solução de ácido pícrico (0,5%) e Na₂CO₃ (2%) (LORCK, 1948). As placas foram seladas e incubadas a 28°C por 48 horas. A produção de HCN é indicada pela mudança da coloração do papel filtro de amarelo para marrom-alaranjado. Como controle negativo foi usada placa sem repique de bactéria.

3.2.4 Avaliação do potencial de linhagens de *Pseudomonas* sp. para promoção de crescimento e proteção de milho (*Zea mays* L.) contra estresse salino.

3.2.4.1 Preparo do solo

O solo utilizado neste estudo foi coletado na Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. A caracterização química do solo (Tabela 9) foi realizada no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), conforme metodologia descrita por Van Raij et al. (2001). A partir da caracterização química do solo foi realizada a calagem (2,9 g.L⁻¹ de calcário) e adubação (N= 0,011 g.L⁻¹; P= 0,136 g.L⁻¹; K= 0,043 g.L⁻¹). O solo foi autoclavado por uma hora, a 120°C, três vezes consecutivas.

Tabela 9 - Caracterização química do solo

PARÂMETROS														
M. O.	P											Cu	Fe	
(g/dm ³)	pH	(mg/dm ³)	K	Ca	Mg	S.B.	H+Al	CTC	V(%)	B	(mg/dm ³)	(mg/dm ³)	Mn	Zn
26	4,1	2	0,5	4	1	5,4	80	85	6	0,21	1,4	54	2,4	0,2

^a M.O., Matéria orgânica; ^b S.B., Soma de bases; ^c H+Al, Ácido potencial; ^d CTC, Capacidade de troca catiônica; ^e V(%), Saturação de Bases

Neste ensaio foram estabelecidos dois tratamentos sem salinização do solo e dois tratamentos com solo salinizado. Para os tratamentos como solo salinizado, foi adicionado NaCl ao solo, ajustando a condutividade elétrica de saturação do solo para um nível (4,04 dS/m) que equivale a perda de 25% da produtividade do milho (AYERS; WESCOT, 1976). Em solo não salinizado, a condutividade elétrica de saturação do solo foi de 0,130 dS/m.

3.2.4.2 Preparo das suspensões bacterianas

Para este estudo foram utilizadas linhagens de *Pseudomonas* selecionadas (24, 30, 103 e 109) pela tolerância a estresse salino e pelo seu potencial para produção de reguladores de crescimento vegetal e mobilização de nutrientes *in vitro* (item 3.2.3). As linhagens 103 e 109 foram caracterizadas pelo FAMES, conforme metodologia descrita no item 2.2.2.6. Adicionalmente, também foi avaliada uma linhagem de *Bacillus* sp. (39) tolerante a estresse salino, isolada de manguezal (SÁ, 2008), pertencente à Coleção de Culturas do LMA da Embrapa Meio Ambiente. As linhagens selecionadas (24, 30, 39, 103 e 109) foram cultivadas em 500 mL de meio TSB 10% por 24 horas, para então serem preparadas as suspensões bacterianas (10^8 células. mL⁻¹, OD_{550nm}= 0,1) de cada isolado em solução salina 0,85%.

As suspensões bacterianas foram utilizadas para microbiolização das sementes de milho e para duas aplicações no solo após emergência das plantulas (5º e 13º dia após emergência).

3.2.4.3 Ensaio em casa-de-vegetação

Sementes de milho (DEKALB 455), após desinfestadas (etanol 70%, 3 min; hipoclorito 3:1, 7 min, etanol 70%, 3 min e lavagens sucessivas em água destilada autoclavada) foram colocadas em suspensões de bactérias, por uma hora, exceto o controle sem bactéria. Após microbiolização, 20 sementes foram plantadas em vasos de 4L com 3L de solo (3.2.4.1) com ou sem salinização. Após a emergência, foi realizado o desbaste para estabelecimento de três plantas por vaso.

Neste ensaio foram estabelecidos 4 condições de cultivo, sendo a primeira sem estresse salino, para avaliação de promoção de crescimento. As demais condições foram com estresse salino: IS) plantas tratadas com irrigação salina (CE_{água de irrigação}= 0,75 dS/m); SS) plantas cultivadas em solo salinizado (CE_{solo}=

4,04 dS/m); SSIS) plantas cultivadas em solo salinizado ($CE_{\text{solo}} = 4,04$ dS/m) e tratadas com irrigação salina ($CE_{\text{água de irrigação}} = 0,75$ dS/m). Para cada condição de cultivo foram estabelecidos 6 tratamentos, sendo 5 com plantas tratadas com suspensões de bactérias (item 3.2.4.2) e uma testemunha. Foram realizadas cinco repetições por tratamento, totalizando 120 unidades experimentais (6 tratamentos x 5 repetições x 4 condições de cultivo).

O delineamento foi inteiramente casualizado. Cada condição de cultivo foi analisada separadamente. Os parâmetros avaliados foram: comprimento de raiz, comprimento da parte aérea, massa seca de raiz, massa seca da parte aérea e área foliar. Diferenças significativas entre os tratamentos foram determinadas pela análise de variância usando o Assistat 7.6 beta (SILVA; AZEVEDO, 2002). Foi utilizado o Teste de Dunnett a 5% de probabilidade para comparação das médias dos tratamentos com a testemunha (sementes não microbiolizadas).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Tolerância à salinidade

A maioria das linhagens de *Pseudomonas* de sedimentos de manguezais isoladas neste estudo (em meio com 2% de sal) são tolerantes a 1 M (5,8%) de NaCl (Figura 18), exceto as linhagens 36, 94, 96 (capazes de crescer até 0,5 M de NaCl) e 40 (capaz de crescer até 0,17 M de NaCl). Nenhuma linhagem foi capaz de crescer nas concentrações de 3 e 5M de sal.

Figura 18 - Crescimento dos isolados avaliado nas diferentes concentrações de NaCl adicionado ao meio de cultivo.

3.3.2 Produção de enzimas e hormônios promotores de crescimento de plantas

3.3.2.1 ACC deaminase

Na análise da produção da enzima ACC deaminase, todas as linhagens de *Pseudomonas* avaliadas foram positivas. Em meio com ACC como única fonte de nitrogênio, todas as linhagens avaliadas apresentaram crescimento, assim como no meio sem ACC, exceto a bactéria 92 (Tabela 10).

3.3.2.2 Produção de ácido 3-indol acético (AIA)

A avaliação da produção de ácido 3-indol acético (AIA) pelos isolados de *Pseudomonas* sp. demonstrou grande potencial destas linhagens para a produção desse hormônio de crescimento vegetal (Figura 19). Os níveis de produção de AIA variam de 3,65 $\mu\text{g/mL}$ à 63,45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 10). Somente 4 linhagens não produziram AIA (90, 102, 105 e 113). A maioria dos isolados produziram entre 1 à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 20). As linhagens 30, 104 e 107 demonstram ser super-produtoras de AIA, produzindo respectivamente 63,45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 62,42 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 57,84 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 10) do hormônio de crescimento vegetal.

Figura 19 - Diferentes níveis de produção de AIA por *Pseudomonas* sp. de sedimentos de manguezais.

Figura 20 - Produção de ácido indol acético por linhagens de *Pseudomonas* spp.

3.3.3 Mobilização de nutrientes

3.3.3.1 Fixação de Nitrogênio

A presença da película de crescimento e coloração azul do meio NFb (Figura 21), foi observada para 68% da linhagens de *Pseudomonas* sp. avaliadas, caracterizando assim a fixação de nitrogênio por estas bactérias (Tabela 10).

No presente estudo, entre as linhagens identificadas, foi verificada a fixação de nitrogênio para as espécies *P. putida* (linhagem 19); *P. plecoglossicida* (linhagem 24) e *Pseudomonas stutzeri* (linhagem 67).

Figura 21 - Fixação de nitrogênio por *P. plecoglossicida* (linhagem 24), à direita. À esquerda o controle negativo.

3.3.3.2 Detecção e quantificação da solubilização de fosfato inorgânico

No teste qualitativo para seleção de *Pseudomonas* capazes de solubilizar fosfato (Figura 22), somente 27,59% das linhagens testadas apresentaram halo (linhagens 24, 30, 62, 87, 97, 99, 103, 110), sendo, portanto solubilizadoras de fosfato (Tabela 10).

Figura 22 - Solubilização de fosfato por linhagens de *Pseudomonas* spp.

O teste quantitativo demonstrou maior sensibilidade para detecção da produção de fosfato solúvel (Figura 23), observada para todas as linhagens. Os níveis de fosfato solúvel produzidos pelas *Pseudomonas* spp. isoladas de sedimentos de manguezais variaram de 26 a $1.735 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 10).

Figura 23 - Quantificação de fosfato solúvel produzido por linhagens de *Pseudomonas* spp.

Tabela 10 - Potencial de linhagens de *Pseudomonas* para promoção de crescimento de plantas

Bactéria/Testes	ACC	Sem ACC	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Fixação de N_2	Solubilização de Fosfato (Qualitativo)	Solubilização de Fosfato ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
19	+	+	17,636	+	-	520,0
24	+	+	23,861	+	+	1.065,0
27	+	+	36,386	+	-	1.369,0
30	+	+	63,451	+	+	1.652,0
62	+	+	4,046	+	+	492,0
67	+	+	39,604	+	-	109,0
86	+	+	37,243	+	-	1.231,0
88	+	+	21,072	+	-	824,0
90	+	+	0	-	-	1.256,0
91	+	+	12,570	-	-	1.121,0
92	+	-	3,949	-	-	26,0
93	+	+	3,656	-	-	-
94	+	+	18,422	-	-	-
95	+	+	26,772	+	-	1.293,0
96	+	+	24,339	-	-	115,0
97	+	+	7,777	-	+	1.098,0
98	+	+	19,546	+	-	1.366,0
99	+	+	7,812	+	+	235,0
100	+	+	6,082	-	-	-
101	+	+	29,921	-	-	1.312,0
102	+	+	0	-	-	497,0
103	+	+	10,527	+	+	83,0
104	+	+	62,426	-	-	892,0
105	+	+	0	+	-	493,0
106	+	+	8,514	+	-	68,0
107	+	+	57,837	-	-	259,0
108	+	+	47,800	+	-	1.735,0
109	+	+	19,648	-	-	1.171,0
110	+	+	14,589	+	+	1.137,0
111	+	+	8,089	-	-	-
112	+	+	20,871	-	-	-

3.3.4 Produção de amônia (NH_3)

Neste estudo, foi observada a produção de amônia por 100% das linhagens, diferindo apenas na intensidade da coloração (amarelo à alaranjado) (Figura 24). As linhagens 27, 62, 86, 87, 90, 98, 101, 102, 103, 104 e 109, foram as que apresentaram coloração mais intensa e mais precipitado produzindo, portanto mais amônia.

Figura 24. Produção de amônia por linhagens de *Pseudomonas* spp. de sedimento de manguezal

3.3.5 Produção de cianeto de hidrogênio (HCN)

Dentre as 31 linhagens de *Pseudomonas* obtidas neste estudo, somente as linhagens 103 e 109 foram capazes de produzir HCN (Figura 25).

Figura 25 - Produção de cianeto de hidrogênio por linhagens de *Pseudomonas* spp.

3.3.6 Avaliação do potencial de linhagens de *Pseudomonas* sp. para promoção de crescimento e proteção de milho (*Zea mays* L.) contra estresse salino

Na avaliação de promoção de crescimento de milho por uma linhagem de *Bacillus* sp. e por linhagens de *Pseudomonas* sp. (24, 30, 103 e 109) isoladas de sedimentos de manguezais foi observado que a linhagem 103, caracterizada pelo FAMES como *P. putida*, promoveu aumento significativo no desenvolvimento da

planta para todos os parâmetros analisados (comprimento da parte aérea e da raiz, massa seca da parte aérea e área foliar), exceto para a massa seca da raiz. As plantas tratadas com a linhagem 103 apresentaram aumentos significativos de 16,65% no comprimento da parte aérea, 20,16% no comprimento da raiz, 61,20% na área foliar e 83,29% na massa seca da parte aérea, quando comparadas a testemunha. Esta linhagem, também promoveu um aumento não significativo na massa seca da raiz de 77,42% (Tabela 11).

A linhagem 109, caracterizada pelo FAMES como *P. fluorescens*, promoveu aumentos significativos de 119,76% na massa seca da raiz e 50,85% na massa seca da parte aérea do milho. As linhagens 24 (*P. plecoglossicida*) e 30 (*Pseudomonas* sp.) promoveram respectivamente, aumentos significativos de 22,31% no comprimento da raiz e de 62,16% na massa seca da parte aérea. A linhagem de *Bacillus* sp. (39) avaliada não promoveu o crescimento da planta (Tabela 11).

Tabela 11 - Avaliação de promoção de crescimento de milho (parâmetros: comprimento da parte aérea e da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz e área foliar) por linhagens de *Pseudomonas* sp. (24, 30, 103 e 109) e *Bacillus* sp. (39) de manguezais. Valores significativos estatisticamente, de acordo com o teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade, estão em negrito e indicados com ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Tratamento	Comprimento Parte Aérea (cm)	Comprimento Raiz (cm)	Área Foliar (cm ²)	Massa Seca Parte Aérea (g)	Massa Seca Raiz (g)
Testemunha	10,03	46,52	130,35	0,407	0,74
24	9,04	56,90 *	167,44	0,550	0,53
30	11,10	52,75	124,50	0,660 **	1,37
39	9,96	52,08	167,56	0,518	1,06
103	11,70 **	55,90 *	210,12 *	0,746 **	1,32
109	11,30	48,65	174,42	0,614 **	1,64 **

Para o milho cultivado com irrigação salina (IS; C.E = 0,75 dS/m) foi verificado um aumento significativo na área foliar de plantas tratadas com as linhagens 30, 103 e 109 de *Pseudomonas* sp. em relação a testemunha. A linhagem 30 também promoveu um aumento expressivo de 84,23% na massa seca da parte aérea (Tabela 12), diferindo estatisticamente ($p < 0,01$) quando comparada a testemunha. No entanto, a linhagem 24 (*P. plecoglossicida*) produziu um efeito deletério no milho irrigado com água salinizada, reduzindo significativamente o comprimento da parte aérea (Tabela 12).

Tabela 12 - Avaliação do desenvolvimento de milho (parâmetros: comprimento da parte aérea e da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz e área foliar) cultivado com irrigação salina e tratado com linhagens de *Pseudomonas* sp. (24, 30, 103 e 109) e *Bacillus* sp. (39) de manguezais. Valores significativos estatisticamente, de acordo com o teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade, estão em negrito e indicados com ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Tratamento	Comprimento Parte Aérea (cm)	Comprimento Raiz (cm)	Área Foliar (cm ²)	Massa Seca Parte Aérea (g)	Massa Seca Raiz (g)
Testemunha IS	8,33	41,73	90,65	0,387	0,554
24 IS	5,60 **	39,30	63,86	0,252	0,266
30 IS	9,80	38,52	142,71**	0,713**	0,794
39 IS	7,83	39,43	122,29	0,467	0,767
103 IS	9,08	46,70	147,07**	0,461	0,539
109 IS	9,63	39,01	167,49**	0,389	0,678

Na avaliação do desenvolvimento de milho cultivado em solo salinizado (SS; C.E= 4,0 dS/m) foi verificado um aumento significativo de 136,79% na área foliar de plantas tratadas com a linhagem 103 (*P. putida*). As linhagens 39, 103 e 109 promoveram aumentos não significativos, de 72%, 106% e 46% na massa seca da parte aérea, respectivamente (Tabela 13). No entanto, a linhagem 24 (*P. plecoglossicida*) não reduziu os efeitos do estresse salino sobre a planta, produzindo um efeito deletério no milho, verificado pela diminuição significativa do comprimento da raiz em relação à testemunha (Tabela 13).

Tabela 13 - Avaliação do desenvolvimento de milho (parâmetros: comprimento da parte aérea e da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz e área foliar) cultivado em solo salinizado (SS) e tratado com linhagens de *Pseudomonas* sp. (24, 30, 103 e 109) e *Bacillus* sp. (39) de manguezais. Valores significativos estatisticamente, de acordo com o teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade, estão em negrito e indicados com ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Tratamento	Comprimento Parte Aérea (cm)	Comprimento Raiz (cm)	Área Foliar (cm ²)	Massa Seca Parte Aérea (g)	Massa Seca Raiz (g)
Testemunha SS	4,10	20,90	30,14	0,164	0,224
24 SS	4,20	11,00*	21,02	0,132	0,142
30 SS	4,15	17,35	37,75	0,162	0,193
39 SS	5,66	20,26	46,11	0,282	0,210
103 SS	5,82	22,26	71,37*	0,338	0,285
109 SS	5,94	22,63	48,69	0,240	0,097

O resultado da avaliação de plantas de milho tratadas com bactérias de manguezais, cultivadas sob condição extrema de estresse salino (solo salinizado e

irrigação salina – SSIS) demonstrou potencial das linhagens 24, 30, 39 e 103 em promover significativamente o crescimento da raiz em relação à testemunha, com destaque para a linhagem 103 (*P. putida*) que também aumentou significativamente a massa seca da raiz e área foliar (Tabela 14). A linhagem 103 também promoveu aumentos não significativos no comprimento e massa seca da parte aérea, reduzindo assim os efeitos do estresse salino sobre a planta.

Tabela 14 - Avaliação do desenvolvimento de milho (parâmetros: comprimento da parte aérea e da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz e área foliar) cultivado em solo salinizado e irrigado com solução salina (SSIS), tratado com linhagens de *Pseudomonas* sp. (24, 30, 103 e 109) e *Bacillus* sp. (39) de manguezais. Valores significativos estatisticamente, de acordo com o teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade, estão em negrito e indicados com ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Tratamento	Comprimento Parte Aérea (cm)	Comprimento Raiz (cm)	Área Foliar (cm ²)	Massa Seca Parte Aérea (g)	Massa Seca Raiz (g)
Testemunha	2,40	2,95	4,79	0,078	0,011
24 SSIS	3,30	8,10 **	6,17	0,068	0,033
30 SSIS	3,85	10,35 **	9,42	0,054	0,028
39 SSIS	2,18	8,50 **	3,18	0,041	0,012
103 SSIS	5,00	12,12 **	22,09 **	0,241	0,071 **
109 SSIS	2,73	5,80	6,19	0,030	0,018

3.4 DISCUSSÃO

Os manguezais apresentam quantidades elevadas de sal em sedimentos (6, 3 g.l⁻¹ sal) (KATHIRESAN, 2001), pois sofrem inundações constantes da água do mar (~33 g.l⁻¹ sal). Os organismos que habitam esse ecossistema são adaptados a essas condições. Dessa forma, no presente estudo foram isoladas *Pseudomonas* de sedimento de manguezal, com o propósito de obter linhagens tolerantes ao estresse salino, capazes de promover o crescimento de plantas nessas condições.

Bactérias do gênero *Pseudomonas*, assim como outras bactérias Gram negativas (*Alteromonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter*) são capazes de habitar ambientes salinos (ZAHARAN, 1997). As *Pseudomonas* de sedimentos de manguezais isoladas neste estudo podem ser classificadas como levemente halofílicas (VENTOSA et al., 1998) ou levemente halotolerantes (LARSEN, 1986), pois a maioria cresce em até 1

M (5,8%) de NaCl (Figura 21), sendo a linhagem 40 não halotolerante, pois cresceu até 0,2 M de NaCl.

Naik et al. (2006) relata o crescimento em até 3% de sal para *Pseudomonas* sp. linhagem PUP6, com potencial para promoção de crescimento e com potencial antifúngico. Aqui observamos para as linhagens de *Pseudomonas* spp. estudadas, maior capacidade de tolerância a salinidade e o potencial dessas bactérias para uso como biofertilizantes.

Além do uso como biofertilizantes, bactérias halotolerantes tem seu potencial reconhecido para uso em outras aplicações biotecnológicas. Estudo revela uma ribonuclease extracelular halofílica de uma *Pseudomonas* sp. 3241 halotolerante (KANLAYAKRIT et al., 2001). Proteinases NaCl-ativadas são produzidas pela linhagem halotolerante de *Virgibacillus* sp. SK33 (SINSUWAN et al., 2008).

Bactérias halotolerantes, como as isoladas no presente estudo, possuem mecanismos de adaptação, que lhes permitem sobreviver em ambientes salinos, como o acúmulo de compostos osmoprotetores (Le RUDULIER et al., 1984; OMORI et al., 1992). A presença de genes de tolerância a estresse salino em plasmídeos também é relatada (QURESHI; MALIK, 1990; AHMED et al., 2003). Estudos recentes têm revelado outros mecanismos para tolerância ao estresse salino por bactérias. Abbas et al. (2004) sugerem o papel do *PhlE* na tolerância ao estresse osmótico. Os autores observaram que o mutante *phlE* *P. fluorescens* F113-D3 foi mais sensível ao estresse osmótico proporcionado pela adição de NaCl ao meio (0,75 M) do que a linhagem selvagem F113. A enzima ACC deaminase pode diminuir ou impedir alguns dos efeitos prejudiciais do etileno em condições de estresse ambiental. Num estudo com plântulas de tomate crescidas sob estresse salino (acima de 172 mM de NaCl), a bactéria *Achromobacter piechaudii* aumentou significativamente o peso fresco e peso seco das plântulas. Essa bactéria, com atividade de ACC deaminase, reduziu a produção de etileno (estimulado sob estresse salino) em níveis elevados de NaCl, porém não reduziu o conteúdo de NaCl, aumentando os níveis de fósforo e potássio, que podem ter contribuído para minimizar os efeitos do sal, conforme sugerido pelos autores (MAYAK et al., 2004).

No presente estudo, todas as linhagens de *Pseudomonas* sp. de sedimentos de manguezais avaliadas produzem a enzima ACC deaminase (Tabela 10). Algumas dessas linhagens (24, 30, 103 e 109) foram avaliadas em casa-de-vegetação no cultivo de milho sob estresse salino, demonstrando potencial para aumentar a

biomassa e área foliar do milho cultivado em diferentes níveis de estresse salino (Tabelas 12 à 14), como também de induzir aumento no comprimento da raiz em condição extrema de estresse (Tabela 14). A linhagem de *Bacillus* sp. 39 avaliada, também aumentou o comprimento da raiz de milho cultivado em alta concentração de sal (Tabela 14) e aumentou a massa seca da parte aérea em condição intermediária de estresse salino (Tabela 13). Em estudo *in vitro*, Sá (2009) relata a capacidade de tolerância ao estresse salino da linhagem de *Bacillus* sp. 39 em função da formação de biofilme. A linhagem 24 (*P. plecoglossicida*) apresentou efeito deletério no desenvolvimento do milho irrigado com solução salina (Tabela 12) e cultivado em solo salinizado (Tabela 13). A linhagem de *P. putida* 103 se destacou na promoção de crescimento do milho em todas as condições de estresse salino e parâmetros avaliados (Tabelas 12 à 14). Dessa forma, podemos sugerir uma correlação da produção da enzima ACC deaminase pelas linhagens de *Pseudomonas* sp. isoladas de sedimentos de manguezais com a redução dos efeitos do estresse salino sobre plantas de milho e com a promoção de crescimento da planta observadas neste estudo (Tabelas 11 à 14). Cheng et al. (2007) relata efeito da linhagem *P. putida* UW4, psicotrófica e produtora de ACC deaminase, na promoção de crescimento de canola sob estresse salino. No entanto, a linhagem mutante (não produtora de ACC deaminase) não promoveu o crescimento da planta sob estresse. Segundo Shaharoona et al. (2006) *Pseudomonas* spp. com atividade de ACC deaminase podem ser importantes para a promoção de crescimento de plantas, conforme observado em cultivo de milho.

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) com a habilidade de degradar o precursor do etileno (aminociclopropano-1-carboxilato) na rizosfera podem impedir que altos níveis de etileno, produzidos em condições de estresse, prejudiquem o desenvolvimento da planta e restabelecer um sistema saudável da raiz (CHEN et al., 2002; GLICK et al., 2007). Muitos estudos demonstraram que plantas tratadas com RPCP com atividade de ACC deaminase, tiveram sua resistência ao estresse ambiental aumentada. Grinchko e Glick (2001) inocularam sementes de tomate com *Pseudomonas putida* com atividade de ACC deaminase e observaram um aumento na resistência da planta. Ghosh et al. (2003) observaram atividade de ACC deaminase em três espécies de *Bacillus* (*B. circulans* DUC1, *B. firmus* DUC2 e *B. globisporus* DUC3), que estimularam o crescimento da raiz de canola sob o estresse de inundações.

Além de minimizar os efeitos da produção de etileno em plantas sob estresse, linhagens de *Pseudomonas* spp. também podem estimular o crescimento de plantas por meio de outros mecanismos de ação, como pela produção de reguladores de crescimento. Estudos relatam a produção de AIA por *Pseudomonas* spp. em resposta aos exsudatos de raiz de milho (BENIZRI et al., 1998; PAN et al., 1999).

Oliveira (2009) observou em seus estudos com bactérias isoladas de cana-de-açúcar, a produção de AIA por linhagens de *Pseudomonas* variando de 0,02 à 7,94 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Quando comparada as concentrações de AIA obtidas no presente estudo (Figura 23), verificamos que as linhagens de *Pseudomonas* de sedimentos de manguezais produzem muito mais AIA que as linhagens da rizosfera de cana-de-açúcar, e possivelmente possuem maior potencial para promoção de crescimento de plantas. No entanto, nem sempre a bactéria que produz maiores níveis de AIA, promoverá maior crescimento da planta. Isso foi demonstrado neste estudo, onde observamos que a linhagem 103 (*P. putida*) que produz a menor quantidade de AIA (10,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Tabela 10) entre as linhagens testadas em casa-de-vegetação, foi a que apresentou melhor resultado na promoção de crescimento de milho (Tabela 11).

A mobilização de nutrientes por bactérias também pode ser importante para promoção de crescimento de plantas. Neste estudo foi verificado que 68% das linhagens de *Pseudomonas* sp. isoladas de sedimento de manguezal são fixadoras de nitrogênio. Por muito tempo acreditou-se que não havia bactérias fixadoras de nitrogênio pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (YOUNG, 1992). Há poucos relatos de diazotróficas pertencentes a este gênero, entre elas estão as espécies *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. mucidolens* e *P. stutzeri* (CHAN et al., 1994; CERIGIOLI et al., 2005; DESNOUES et al., 2003). Este estudo é o primeiro a relatar a fixação de nitrogênio pela espécie *Pseudomonas plecoglossicida* (linhagem 24). Esta bactéria promoveu significativamente o crescimento da raiz de milho (Tabela 11), no entanto, sob estresse salino apresentou efeito deletério a planta (Tabelas 12 e 13).

No presente estudo, foi avaliada a solubilização de fosfato por *Pseudomonas* sp. de sedimentos de manguezais. O teste quantitativo para produção de fosfato solúvel permitiu verificar altos níveis de fosfato solúvel produzidos pelas linhagens de *Pseudomonas* sp. avaliadas *in vitro* (Tabela 10). Chen et al. (2006), utilizando o mesmo meio de cultura (NBRIP) para isolar bactérias solubilizadoras de fosfato e quantificar os níveis de produção, obtiveram valores de 31,5 até 519 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de

fosfato solúvel, enquanto que no presente estudo observamos níveis fosfato solúvel variando de 26 à 1.735 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 10).

Olivera et al. (2011) observaram uma correlação positiva entre a atividade de solubilização de fosfato *in vitro* de uma linhagem de *Pseudomonas* sp. (LG) com o aumento no conteúdo de P em plantas de feijão inoculadas com essa bactéria. No presente estudo, as linhagens de *Pseudomonas* sp. (24, 30 e 109) avaliadas em casa-de-vegetação para promoção de crescimento de milho, produziram altos níveis (acima de 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de fosfato solúvel *in vitro* (Tabela 10) e promoveram significativamente o crescimento da planta *in vivo* (Tabela 11). A linhagem 24 (*P. plecoglossicida*) aumentou significativamente o comprimento da raiz, a linhagem 30 (*Pseudomonas* sp.) aumentou significativamente a massa seca da parte aérea e a linhagem 109 aumentou significativamente a massa seca da raiz e da parte aérea (Tabela 11). No entanto, a linhagem 103 (*P. putida*) que produziu somente 83 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de fosfato, foi a bactéria que mais estimulou o crescimento do milho, produzindo aumentos significativos em relação a testemunha em todos os parâmetros avaliados, exceto para a massa seca da raiz (Tabela 11).

Em sedimentos marinhos, fosfatos usualmente precipitam devido à abundância de cátions na água intersticial (água do sedimento), fazendo do fósforo um elemento altamente indisponível para as plantas. No entanto, bactérias residentes de manguezais solubilizadoras de fosfato são potenciais fornecedoras de formas solúveis de fósforo para as plantas (BASHAN; HOLGUIN, 2002). O ambiente de manguezal tem sido importante para obtenção de bactérias solubilizadoras de fosfato, como observado no presente estudo para o gênero *Pseudomonas* sp. Bashan e Holguin (2002) isolaram bactérias solubilizadoras de fosfato de raízes de mangue-negro (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter taylorae*, *Enterobacter asburiae* e *Kluyvera cryocrescens*) e de raízes de mangue-branco (*Chryseomonas luteola* e *Pseudomonas*).

Existem mecanismos indiretos de promoção de crescimento de plantas, relacionados a supressão de fitopatógenos, como a produção de amônia que foi verificada para todas as linhagens de *Pseudomonas* spp. avaliadas. Assim como no presente estudo, Meyer e Holfte (1997) também verificaram que 100% de seus isolados produziram amônia, que pode participar no controle de fitopatógenos, causando a morte destes micro-organismos por ação direta sobre organismo alvo, bem como podem induzir resistência das plantas contra infecção destes.

Neste estudo, a produção de cianeto de hidrogênio *in vitro* foi observada para apenas duas linhagens (103 e 109) de *Pseudomonas* sp. isoladas de sedimentos de manguezais. Naik et al. (2006) relata que uma linhagem de *Pseudomonas* (PUP6), com potencial para promoção de crescimento de plantas e controle de fitopatógenos, não produz HCN, como a maioria dos isolados do presente estudo. No entanto, a produção de HCN costuma ser comum para o grupo de *Pseudomonas* na rizosfera, como demonstrado em alguns estudos, aproximadamente 50% das *Pseudomonas* isoladas da rizosfera de batata e de trigo são capazes de produzir o HCN *in vitro* (BAKKER e SCHIPPERS, 1987; SCHIPPERS et al., 1990). Verma et al. (2010) observou a produção de HCN por uma linhagem de *Pseudomonas fluorescens*, enquanto as espécies *Bacillus megaterium*, *Rhizobium* sp. e *A. achroococcum* não produziram o composto volátil.

Alguns estudos atribuem o efeito de supressão de doenças de plantas ao HCN, como a supressão da podridão preta na raiz de tomate causada por *Meloidogyne javanica* (VOISARD et al., 1989). Entretanto, outros estudos relatam efeitos prejudiciais em plantas, como inibição do metabolismo energético de células de raiz da batata (BAKKER; SCHIPPERS, 1987) e inibição do crescimento das raízes em *Arabidopsis* (RUDRAPPA et al., 2008). No presente estudo, as linhagens de *Pseudomonas* sp. 103 e 109, que produzem HCN, não apresentaram efeitos prejudiciais a planta, ao contrário, estimularam o crescimento da raiz de milho (Tabela 11).

Os resultados deste estudo ressaltam o potencial do gênero *Pseudomonas* sp. para a promoção de crescimento de plantas (Tabela 11). No presente estudo verificamos a capacidade de promoção de crescimento de milho pelas linhagens 24, 30, 103 e 109, caracterizadas respectivamente como *P. plecoglossicida*, *Pseudomonas* sp., *P. putida* e *P. fluorescens*. Correa et al. (2011) observaram a promoção de crescimento de pepino hidropônico por *P. stutzeri* MB-P3A-49 isolada de manguezal. Em tomate hidropônico, Van Peer e Schippers (1988) também verificaram que a aplicação de *Pseudomonas* spp. promoveram o crescimento das plantas, aumentando a massa do sistema aéreo e radicular. Outros estudos relatam a capacidade de linhagens de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens* para aumentar o crescimento da raiz e da parte aérea de canola, trigo e batata (GHOLAMI et al., 2009). Vazquez et al. (2000) relataram o potencial de uso de *P.*

stutzeri na promoção de crescimento de plantas utilizadas no reflorestamento em mangues áridos.

De modo geral, o potencial das linhagens de *Pseudomonas* spp. isoladas de sedimentos de manguezais para promoção de crescimento de plantas revelado nos estudos *in vitro* foi confirmado para linhagens selecionadas em condições de casa-de-vegetação. Adicionalmente, algumas das linhagens de *Pseudomonas* sp. avaliadas demonstraram capacidade de aumentar a tolerância de plantas ao estresse salino (Tabelas 11 à 14), estimulando o crescimento de milho cultivado em diferentes condições de estresse, podendo portanto, ser aplicadas em áreas agrícolas com solos salinizados ou que fazem uso de irrigação salina.

A salinidade reduz a capacidade das plantas para absorver a água, reduzindo rapidamente a taxa de crescimento, desencadeando um conjunto de alterações metabólicas. Inicialmente ocorre redução do crescimento da parte aérea devido a sinais hormonais produzidos pelas raízes. Quantidades elevadas de sal se absorvidos pela planta, podem atingir níveis tóxicos, causando a senescência prematura, reduzindo a fotossíntese e área foliar (MUNNS, 2002). Neste estudo, foi possível minimizar esses efeitos descritos da salinidade sobre a planta, pela aplicação na semente e no solo das linhagens de *Pseudomonas* de manguezais, com destaque para a linhagem 103, *P. putida* que aumentou significativamente o desenvolvimento da raiz e da parte aérea do milho sob estresse salino. O ambiente de manguezal demonstrou ser uma importante fonte de bactérias com potencial para uso como biofertilizantes em solos salinos.

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir:

- A triagem com base no isolamento seletivo de *Pseudomonas* spp. de sedimentos de manguezais e detecção do gene *gacA* foi eficiente para seleção de linhagens produtoras de compostos de interesse biotecnológico;
- Os extratos brutos das linhagens de *Pseudomonas* sp. demonstraram atividade antimicrobiana de amplo espectro. Assim, podemos considerar o ambiente de manguezal uma importante fonte de bactérias produtoras de metabólitos antifúngicos e antibacterianos;
- As espécies de *Pseudomonas* estudadas apresentam grande potencial para produção das enzimas lacase, celulase e lipase;
- A produção de antimicrobianos e enzimas pelas *Pseudomonas gacA* positivas sugerem o envolvimento deste gene na síntese desses compostos;
- As técnicas independentes de cultivo demonstraram diferenças na composição das comunidades de *Pseudomonas* dos diferentes manguezais amostrados;
- Conforme análise de DGGE, a comunidade de *Pseudomonas* é modulada pelas condições ambientais (características físico-químicas e contaminação com óleo cru) e não pelo potencial competitivo dessas bactérias;
- As linhagens de *Pseudomonas* spp. avaliadas são halotolerantes, apresentam atividade de ACC deaminase, produzem altos níveis de AIA, são capazes de fixar nitrogênio, solubilizar fosfato e produzir amônia, demonstrando grande potencial dessas bactérias em promover o crescimento de plantas para uso em solos salinos;
- A linhagem 103, *P. putida*, se destacou entre as linhagens halotolerantes para promoção do crescimento de milho e para redução dos efeitos do estresse salino sobre planta.

REFERÊNCIAS*

- ABBAS, A.; MCGUIRE, J. E.; CROWLEY, D.; BAYSSE, C.; DOW, M.; O'GARA, F. The putative permease PhIE of *Pseudomonas fluorescens* F113 has a role in 2,4-diacetylphloroglucinol resistance and in general stress tolerance. **Microbiology**, v. 150, p.2443–2450, 2004.
- ACHOUAK, W.; THIERY, J. M.; ROUBAUD, P.; HEULIN, T. Impact of crop management on intraspecific diversity of *Pseudomonas corrugata* in bulk soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, p. 11–19, 2000.
- ALFANO, J.; COLLMER, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 5655–5662, 1997.
- ALONGI, D. M. The dynamics of benthic nutrient pools and Xuxes in tropical mangrove forests. **Journal of Marine Research**, v. 54, p. 123–148, 1996.
- ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.417–432, 2009.
- ANDREW, M.; DAVID, L. R.; O'DONNELL, A. G. Novel bacterial diversity recovered from the rhizosphere of oilseed rape (*Brassica napus*) determined by the analysis of 16S ribosomal DNA. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 78, p. 13–21, 2000.
- ARIMA, K.; IMANAKA, I.; KOUSAKA, M.; FUKUTA, A.; TAMURA, G. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 28, p. 575-576, 1969.
- ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, J. W.; van ELSAS, J. D.; van VUURDE, J. W. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4906-4914, 2002.
- AYERS, R. S.; WESTCOT, D.W. Irrigation and Drainage. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, nº 24, 1976.
- BAKKER, A. W., SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p. 451–457, 1987.
- BAKKER, P. A., PIETERSE, C. M., van LOON, L. C. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, v. 97, p. 239–243, 2007.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.
NBR 6023: informação e documentação: referências:
 elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARAN, E.; HAMBREY, J. "Mangrove Conservation and Coastal Management in Southeast Asia: What Impact on Fishery Resources?" **Marine Pollution Bulletin**, v. 37, p. 431-440, 1998.

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

BENIZRI, E.; COURTADE, A.; PICARD, C.; GUCKERT, A. Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 1481-1484, 1998.

BLOEMBERG, G. V., LUGTENBERG, B. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 343-350, 2001.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. Improved Silver Stain of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrilamde Gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BLUMER, C.; HEEB, S.; PESSI, G.; HAAS, D. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 96, p. 14073-14078, 1999.

BORNEMAN, J.; SKROCH, P. W.; O'SULLIVAN, K. M.; PALUS, J. A.; RUMJANEK, N. G.; JANSEN, J. L.; NIENHUIS, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 62, p. 1935-1943, 1996.

BORNEMAN, J.; TRIPELTT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 63, p. 2647-2653, 1997.

BULL, C. T.; DUFFY, B.; VOISARD, C.; DÉFAGO, G.; KEEL, C.; HAAS, D. Characterization of spontaneous *gacS* and *gacA* regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, p. 327-336, 2011.

CAMARA, B.; STROMPL, C.; VERBARG, S.; DIETMAR, S. C.; PIEPER, H.; BRIAN, J. *Pseudomonas reinekei* sp. nov., *Pseudomonas moorei* sp. nov. and *Pseudomonas mohnii* sp. nov., novel species capable of degrading chlorosalicylates or isopimaric acid. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 923-931, 2007.

CERIGIOLI, M.M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento**. 132 f. Tese Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Genética e Evolução, São Carlos, 2005.

CHAN, Y. K.; BARRAQUIO, W. L.; KNOWLES, R. N₂-fixing pseudomonads and related soil bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 95–118, 1994.

CHEN, H.; QUALLS, R. G.; MILLER, G. C. Adaptive responses of *Lepidium latifolium* to soil flooding: biomass allocation, adventitious rooting, aerenchyma formation and ethylene production. **Environmental and Experimental Botany**, v. 48, p. 119–128, 2002.

CHEN, Y. P.; REKHA, P. D.; ARUN, A. B.; SHEN, F. T.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, v. 34, p. 33–41, 2006.

CHENG, Z.; PARK, E.; GLICK, B. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 912–918, 2007.

CHOUDHARY, S.; SAR, P. Characterization of a metal resistant *Pseudomonas* sp. isolated from uranium mine for its potential in heavy metal (Ni(2+), Co(2+), Cu(2+), and Cd(2+)) sequestration. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2482–2492, 2009.

CLAUS H.; FILIP, Z. Degradation and transformation of aquatic humic substances by laccase-producing fungi *Cladosporium cladosporioides* and *Polyporus versicolor*. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 26, p. 180–185, 1998.

CLAYS-JOSSERAND, A.; GHIGLIONE, J. F.; PHILIPPOT, L.; LEMANCEAU, P.; LENS, R. Effect of soil type and plant species on the fluorescent pseudomonads nitrate dissimilating community. **Plant and Soil**, v. 209, p. 275–282, 1999.

COELHO-JR, C. **Ecologia de manguezais: zonação e dinâmica da cobertura vegetal em gradientes ambientais, Cananéia, São Paulo, Brasil**. 166 f. Tese de doutorado, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 2003.

COLE, J. R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R. J. et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 141–145, 2009.

CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, D. A.; BIDOIA, E. D.; ANGELIS, D. F. Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 99–106, 2005.

CORRÊA, E. B. **Controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) em cultivos hidropônicos**. 133 f. Tese Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2009.

CORRÊA, E. B.; GALVÃO, J. A. H.; BETTIOL, W. Controle biológico da podridão radicular e promoção de crescimento em pepino hidropônico com microrganismos de manguezais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 130–136, 2011.

COSTA, R.; GOMES, N. C. M.; KROGERRECKLENFORT, E.; OPELT, K.; BERG, G.; SMALLA, K. *Pseudomonas* communitie structure and antagonistic potential in the rhizosphere: insights gained by combining phylogenetic and functional gene-based analyses. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 2260-273, 2007.

CURY, J.C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado por petróleo**. 84f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Solos e Nutrição de Plantas), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

DANOVARO, R.; GAMBI, C.; MIRTO, S. Meiofaunal production and energy transfer efficiency in a seagrass *Posidonia oceanica* bed in the western Mediterranean. **Marine Ecology Progress Series**, v. 234, p. 95-104, 2002.

DEAN, J. F. D.; ERIKSSON, KEL. Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. **Holzforschung**, v. 48, p. 21–33, 1994.

De LEIJ, F. A. A. M.; DIXON-HARDY, J. E.; LYNCH, J. M. Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing and non-producing strains of *Pseudomonas fluorescens* on root development of pea seedlings in three different soil types and its effect on nodulation by *Rhizobium*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 114–121, 2002.

DESNOUES, N.; LIN, M.; GUO, X.; MA, L.; O-LOPEZ, R. C.; ELMERICH, C. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. **Microbiology**, v. 149, p. 2251–2262, 2003.

De SOUZA, J. T. Antibiotic producing *Pseudomonas* spp. In: de SOUZA, J.T. **Distribution, diversity, and activity of antibiotic producing *Pseudomonas* spp.** 161 f. Tese Universidade Wageningen, Holanda, 2002.

De SOUZA, J. T.; MAZZOLA, M.; RAAIJMAKERS, J. M. Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. **Environmental Microbiology**, v. 5, p.1328–1340, 2003.

De WEGER, L. A.; van der BIJ, A. J.; DEKKERS, L. C.; SIMONS, M.; WIJFFELMANN, C. A.; LUGTENBERG, B. J. J. Colonization of the rhizosphere of croplants by plant-beneficial *pseudomonads*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 17, p. 221–228, 1995.

DIAS, A. C. F. **Diversidade bacteriana em sedimento de manguezal na Ilha do Cardoso – Cananeia - São Paulo**. 61p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de São Paulo, 2008.

DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D.; RIGONATO, J.; FIORE, M. F.; MELO, I. S.; ARAÚJO, W. L. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, p. 541-551, 2010.

DIAS, A. C. F.; DINI-ANDREOTE, F.; TAKETANI, R. G.; TSAI, S. M.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S.; ARCHAEL, F. D. A. Communities in the sediments of three contrasting mangroves. **Journal of Soils and Sediments**, 2011 (In press).

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60p.

DOWLING, D. N.; GARA, F. O. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. **Trends in Biotechnology**, v. 12, p. 133–141, 1994.

DRENKARD, E.; AUSUBEL, F. M. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. **Nature**, v. 416, p. 740–743, 2002.

DUA, M.; SING, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A. K. Biotecnologia e biorremediação: Sucessos e limitações. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 59, p. 143-152, 2003.

DUFFY, B. D.; DEFAGO, G. Controlling Instability in *gacS-gacA* Regulatory Genes during Inoculant Production of *Pseudomonas fluorescens* Biocontrol Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3142–3150, 2000.

DUKE, N. C.; BALL, M. C.; ELLISON, J. C. Factors influencing biodiversity and distributional gradients in mangroves. **Global Ecology Biogeographic Letter**, v. 7, p. 27-47, 1998.

EHMANN, A. The van urk: salkowski reagent: a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. **Journal of Chromatography**, v. 132, p. 267-276, 1977.

ELLIS, R. J.; TIMMS-WILSON, T. M.; BERINGER, J. E.; RHODES, D.; RENWICK, A.; STEVENSON, L.; BAILEY, M. J. Ecological basis for biocontrol of damping-off disease by *Pseudomonas fluorescens* 54/96. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 454–463, 1999.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/p/pseudomonas.html>> Acesso em: 05 janeiro 2012.

FAUTH, J. E.; BERNARDO, J.; CAMARA, M.; RESETARITS, W. J.; VAN BUSKIRK, J.; MCCOLLUM, S. A. Simplifying the jargon of community ecology: a conceptual approach. **The Americ Naturalist**, v. 147, p. 282-286, 1996.

FEDRIZZI, S.M.G. **Produção de metabólitos antimicrobianos e sideróforos de isolados provenientes da Terra Preta Antropogênica da Amazônia Ocidental**. 117 f. Tese (Doutorado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura) Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FELSKE, A.; RHEIMS, H.; WOLTERINK A.; STACKEBRANDT, E.; AKKERMANS, A. D. L. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. **Microbiology**, v. 143, p. 2983–2989, 1997.

FELSKE, A.; WOLTERINK, A.; van LIS, R.; AKKERMANS, A. D. L. Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in a Drentse grassland soils (The Netherlands). **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 54, p. 871–879, 1998.

FRIDLENDER, M.; INBAR, J.; CHET, I. Biological control of soil borne plant pathogens by a 1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, p.1211–1221, 1993.

GEORGAKOPOULOS, D. G.; FIDDAMAN, P.; LEIFERT, C. et al. Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 1078-1086, 2002.

GHOSH, S.; PENTERMAN, J. N.; LITTLE, R. D.; CHAVEZ, R.; GLICK, B. R. Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 277–281, 2003.

GIBELLO, A.; VELA, A. I.; MARTIN, M.; MENGES, G.; ALONSO, P. Z.; GARBI, C.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F. *Pseudomonas composti* sp. nov., isolated from compost samples. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2962-2966, 2011.

GINOLHAC, A.; JARRIN, C.; GILLET, B.; ROBE, P.; PUJIC, P.; TUPHILE, K.; BERTRAND, H.; VOGEL, T.M.; PERRIERE, G.; SIMONET, P.; NALIN, R. Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5522-5527, 2004.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 109–117, 1995.

GLICK, B. R.; TODOROVIC, B.; CZARNY, J.; CHENG, Z.; DUAN, J.; McCONKEY, B. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 26, p. 227–242, 2007.

GOMES, N. C. M.; BORGES, L. R.; PARANHOS, R.; PINTO, F. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S; SMALLA, K. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, p. 96–109, 2008.

GOMES, N. C. M.; HEUER, H.; SCHONFELD, J.; COSTA, R.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, v. 232, p. 167-180, 2001.

GONZÁLEZ, N.; HEEB, S.; VALVERDE, C.; KAY, E.; REIMMANN, C.; JUNIER, T.; HAAS, D. Genome-wide search reveals a novel GacA-regulated small RNA in *Pseudomonas* species. **BMC Genomics**, v. 9, p.167, 2008.

GOTTARDO, E. P. **Diversidade de bacterias diazotroficas endofiticas de mangue vermelho (*Rhizophora mangle*) e avaliação do potencial biotecnológico**. 85 f. Dissertação de Mestrado (Biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GOULD, W. D.; HAGEDORN, C.; BARDINELLI, T. R.; ZABLOTOWICZ, R. M. New Selective Media for Enumeration and Recovery of Fluorescent *Pseudomonads* from Various Habitats. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 28-32, 1985.

GRICHKO, V. P.; GLICK, B. R. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 11–17, 2001.

GROSS, H.; LOPER, J. E. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1408–1446, 2009.

GULATI, A.; RAHI, P; VYAS,P. Characterization of phosphate-solubilizing fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of seabuckthorn growing in the cold deserts of Himalayas. **Current Microbiology**, v. 56, p. 73-79, 2008.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWANI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

GUSTI, W.; ALIT-SUSANTA, N.; TAKIKAWA, Y. Analysis of the *gacS-gacA* regulatory genes of spontaneous mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain PfG32R. **Journal of General Plant Pathology**, v. 72, p. 159–167, 2006.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p.307-319, 2005.

HAAS, D.; KEEL, C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. **Annual Review Phytopathology**, v. 41, p. 117–153, 2003.

HAMMER, P. E.; EVENSEN, K. B. Post harvest control of *Botrytis cinerea* on cut flowers with pyrrolnitrin. **Plant Disease**, v. 77, p. 283-286, 1993.

HARDHAM, A.R. Cell biology of plant-oomycete interactions. **Cellular Microbiology**, v.9 p.31-39, 2007.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, v. 35, p. 1-21, 1998.

HEEB, S.; HAAS, D. Regulatory roles of the GacS/ GacA two-component system in plant-associated and other Gram negative bacteria. **Molecular Plant Microbe Interact**, v. 14, p. 1351–1363, 2001.

HENRIQUES, I. S.; ALVES, A.; TACÃO, M.; ALMEIDA, A.; CUNHA, A.; CORREIA, A. Seasonal and spatial variability of free-living bacterial community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 68, p. 139-148, 2006.

HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: VAN ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H (Ed.). **Modern Soil Microbiology**. New York: M. Dekker, 1997. p. 353-373.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HEUER, H.; SMALLA, K. Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-producing transgenic variants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 28, p. 357-371, 1999.

HEYRMAN, J.; MERGAERT, J.; DENYS R. J. The use of fatty acid methyl ester analysis (FAME) for the identification of heterotrophic bacteria present on three mural paintings showing severe damage by microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 181, p. 55–62, 1999.

HOLGUIN, G.; GUZMAN, M. A.; BASHAN, Y. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 101, p. 207-216, 1992.

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.; VAZQUEZ, 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.

HOWELL, C. R.; STIPANOVIC, R. D. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. **Phytopathology**, v. 70, p. 712-715, 1980.

HUMAIR, B.; WACKWITZ, B.; HAAS, D. GacA controlled activation of promoters for small RNA genes in *Pseudomonas fluorescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 1497–1506, 2010.

HUNG, W.L.; WADE, W.G.; BODEN, R.; KELLY, D.P.; WOOD, A.P. Facultative methylotrophs from the human oral cavity and methylotrophy in strains of *Gordonia*, *Leifsonia*, and *Microbacterium*. **Archives Microbiology**, v. 193, p.407-417, 2011.

ISNANSETYO, A.; KAMEI, Y. MC21-A, a bactericidal antibiotic produced by a new marine bacterium, *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov. O-BC30T, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 480–488, 2003.

IWAKI, H.; WANG, S.; GROSSE, S.; BERGERON, H.; NAGAHASHI, A.; LERTVORACHON, J.; YANG, J.; KONISHI, Y.; HASEGAWA, Y.; LAU, P. C. Pseudomonad cyclopentadecanone monooxygenase displaying an uncommon spectrum of Baeyer-Villiger oxidations of cyclic ketones. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 2707-2720, 2006.

JOHNSEN, K.; ANDERSON, S.; JACOBSEN, C. S. Phenotypic and genotypic characterisation of phenanthrene-degrading fluorescent *Pseudomonas* biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3818–3825, 1996.

JOUSSET, A.; SCHEU, S.; BONKOWSKI, M. Secondary metabolite production facilitates establishment of rhizobacteria by reducing both protozoan predation and the competitive effects of indigenous bacteria. **Functional Ecology**, v. 22, p. 714–719, 2008.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H.N., ed. **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969.

KANLAYAKRIT, W.; IKEDA, T.; TOJAI, S.; RODPRAPAKORN, M.; SIRISANSANEEYACUL, S. Isolation and characterization of extracellular halophilic ribonuclease from halotolerant *Pseudomonas* sp. **Kasetsart Journal: Natural Science**, v. 35, p. 179-187, 2001.

KARIGAR, C.; MAHESH, A.; NAGENAHALLI, M.; YUN, D.J. Phenol degradation by immobilized cells of *Arthrobacter citreus*. **Biodegradation**, v.17, p. 47-55, 2006.

KAY, E.; DUBUIS, C.; HAAS, D. Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, p.17136–17141, 2005.

KAY, E.; HUMAIR, B.; DÉNERVAUD, V.; RIEDEL, K.; SPAHR, S.; EBERL, L.; VALVERDE, C.; HAAS, D. Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v.188, p. 6026–6033, 2006.

KEEL, C.; SCHNIDER, U.; MAURHOFER, M.; VOISARD, C.; LAVILLE, J.; BURGER, U.; WITHNER, P.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite

2,4-diacetylphloroglucinol. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 5, p. 4–13, 1992.

KERSTERS, K.; LUDWING, W.; VANCANNEYT, M.; De VOS, P.; GILLIS, M.; SCHLEIFER, K. Recent changes in the classification of the pseudomonads: an overview. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, p. 465–477, 1996.

KHANDEPARKER, R.; VERMA, P.; DEOBAGKAR, D. A novel halotolerant xylanase from marine isolate *Bacillus subtilis* cho40: gene cloning and sequencing. **New Biotechnology**, v.28, p.814-821, 2011.

KIM, T. K.; FUERST, J. A. Diversity of polyketide synthase genes from bacteria associated with the marine sponge *Pseudoceratina clavata*: culture-dependent and culture-independent approaches. **Environmental Microbiology**, v. 8, p.1460-1470, 2006.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of bases substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, p. 301-307, 1954.

KITTEN, T.; KINSCHERF, T. G.; MCEVOY, J. L.; WILLIS, D. K. A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 917–929, 1998.

KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROT, M. N. Enhancing plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, v. 286, p. 885–86, 1980.

KORDEL, M.; HOFMANN, B.; SCHOMBURG, D.; SCHIMID, R. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction data. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 4836-4841, 1991.

KUMAR, R. S.; AYYADURAI, N.; PANDIARAJA, P.; REDDY, A. V.; VENKATESWARLU, Y.; PRAKASH, O.; SAKTHIVEL, N. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 145–154, 2005.

KUMAR, S.; KUNDU, S.; PAKSHIRAJAN, K.; DASU, V. V. Cephalosporins determination with a novel microbial biosensor based on permeabilized *Pseudomonas aeruginosa* whole cells. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 151, p. 653–664, 2008.

LACERDA, L. D. Updating global mercury emissions from small-scale gold mining and accessing its environmental impacts. **Environmental Geology**, v. 43, p. 308-314, 2003.

LAMBAIS, M. R.; CROWLEY, D. E.; CURY, J. C.; BULL, R. C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science**, v. 312, p. 1917-1917, 2006.

LAMONT, I. L.; MARTIN, L. W. Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 149, p. 833-842, 2003.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. ClustalW and ClustalX version 2. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LARSEN, H. Halophilic and halotolerant microorganisms - an overview and historical perspective. **FEMS Microbiology Letters**, v. 39, p. 3-7, 1986.

LATOUR, X.; LEMANCEAU, P. Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. **Agronomie**, v. 17, p. 427-443, 1997.

LATOUR, X.; CORBERAND, T. S.; LAGUERRE, G.; ALLARD, F.; LEMANCEAU, P. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2449-2456, 1996.

LAURSEN, J. B.; NIELSEN, J. Phenazin natural products: biosynthesis, synthetic analogues and biological activity. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 1663-1685, 2004.

LAVILLE, J.; VOISARD, C.; KEEL, C.; MAURHOFER, M.; DEFAGO, G.; HAAS, D. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 89, p. 1562-1566, 1992.

LEMANCEAU, P.; ALABOUVETTE, C. Biological control of fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and nonpathogenic *Fusarium*. **Crop Protection**, v. 10, p. 279-286, 1991.

Le RUDULIER, D.; STROM, A. R. DANDEKAR, A. M.; SMITH, L. T.; VALENATINE, R.C. Molecular biology of osmoregulation. **Science**, v. 214, p. 1064-1068, 1984.

LI,D.; LI,Z.; YU,J.; CAO,N.; LIU,R.; YANG,M. Characterization of bacterial community structure in a drinking water distribution system during an occurrence of red Water. **Applied and Environmental Microbiolology**, v. 76, p. 7171-7180, 2010.

LIU, J.; ZHANG, Z.; ZHU, H.; DANG, H.; LU, J.; CUI, Z. Isolation and characterization of amylase from marine *Pseudomonas* sp. K6-28-040. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 2733-2740, 2011.

LOPER, J. E.; BUYER, J. S. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 4, p. 5–13, 1991.

LORCK, H. Production of hydrocyanic acid from bacteria. **Physiologia Plantarum**, v. 1, p. 142–146, 1948.

LOTTMANN, J.; BERG, G. Phenotypic and genotypic characterization of antagonistic bacteria associated with roots of transgenic and non-transgenic potato plants. **Microbiological Research**, v. 156, p. 75–82, 2001.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; De BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 81–125, 1999.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; KLUGBAUER, N.; WEIZENEGGER, M.; NEUMAIER, J.; BACHLEITNER, M.; SCHELEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. **Electrophoresis**, v. 19, p. 554–568, 1998.

LUGOMELA, C.; BERGMAN, B. Biological N₂-fixation on mangrove pneumatophores: preliminary observations and perspectives. **Ambio**, v. 31, p. 7–8, 2002.

LUGTENBERG, B. J. J.; CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 373–383, 2002.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Antibiotics: isolation and characterization. In: **Brock Biology of microorganisms**, 8. ed., New Jersey: Prentice-Hall International Inc., 1997, p. 440–442.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, A. S. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 1989. 201p.

MARINHO, P. R.; MOREIRA, A. P. B.; PELLEGRINO, F. L. P. C.; MURICY, G.; BASTOS, M. C. F.; Dos SANTOS, K. R. N.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; LAPORT, M. S. Marine *Pseudomonas putida*: a potential source of antimicrobial substances against antibiotic-resistant bacteria. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 678–682, 2009.

MARUTANI, M.; TAGUCHI, F.; OGAWA, Y.; HOSSAIN, M. M. et al. Gac two-component system in *Pseudomonas syringae* pv. tabaci is required for virulence but not for hypersensitive reaction. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 279, p. 313–322, 2008.

MAURHOFFER, M.; KEEL, C.; SCHNIDER, U.; VIOSARD, C.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. **Phytopathology**, v. 82, p. 190–195, 1992.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomatoes plants to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 565–572, 2004.

MAZZOLA, M.; COOK, R. J.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M.; PIERSON, L. S. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2616–2624, 1992.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2000, v.2, 388p.

MELO, I. S.; SANHUEZA, R. M. V. **Métodos de seleção de micro-organismos antagônicos a fitopatógenos**: manual técnico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1995, 72 p.

MENDES, R.; KRUIJT, M.; BRUIJN, I.; DEKKERS, E.; van der VOORT, M.; SCHNEIDER, J. H. M.; PICENO, Y. M.; DESANTIS, T. Z.; ANDERSEN, G. L.; BAKKER, P. A. H. M.; RAAIJMAKERS, J. M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, v. 332, p. 1097-1100, 2011.

De MEYER G.; HÖFTE, M. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. **Phytopathology**, v. 87, p. 588-593, 1997.

MILLING, A; SMALLA, K.; MAIDL, F. X.; SCHLOTTER, M.; MUNCH, J. C. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. **Plant and Soil**, v. 226, p. 23-39, 2004.

MISKO, A. L.; GERMIDA, J. J. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of grown canola. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 399-407, 2002.

MONTAÑEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P. R.; HARDARSON, G.; SICARD M. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, p. 253–263, 2009.

MULET, M.; LALUCAT, J.; GARCÍA-VALDÉS, E. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 1513–1530, 2010.

MULYA, K.; WATANABE, M.; GOTO, M.; TAKIKAWA, Y.; TSUYUMU, S. Suppression of bacterial wilt disease of tomato by root-dipping with *Pseudomonas fluorescens* PfG32R: the role of antibiotic substances and siderophore production. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 62, p.132–140, 1996.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 239–250, 2002.

MUYZER, G.; DEWAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S Ribosomal RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 127-141, 1998.

MYERS, D. F.; STROBEL, G. A. *Pseudomonas syringae* as a microbial antagonist against *C. ulmi* in the apoplast of American elms. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 80, p. 389-394, 1983.

NAIK, P. R.; RAMAN, G.; NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. **BioMed Central Microbiology**, v. 8, 2008. doi:10.1186/1471-2180-8-230

NAIK, P. R.; SAKTHIVEL, N. Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 538–546, 2006.

NAIR, S. Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2957-2962, 1987.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, p. 265-270, 1999.

NEDWELL, D. B.; BLACKBURN, T. H.; WIEBE, J. Dynamic nature of the turnover of organic carbon, nitrogen and sulphur in the sediments of a Jamaican mangrove forest. **Marine Ecology Progress Series**, v. 110, p. 223-231, 1994.

NIELSEN, T. H.; CHRISTOPHERSEN, C.; ANTHONI, U.; SORENSEN, J. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 80–90, 1999.

NISHIMORI, E.; KITA-TSUKAMOTO, K.; WAKABAYASHI, H. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 83–89, 2000.

NITSCHKE, M.; SIDDHARTHA, G. V. A. O.; COSTA, J. C. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 621–630, 2011.

ODACI, D.; SEZGINTÜRK, M. K.; TIMUR, S.; PAZARLIOGLU, N.; PILLOTON, R.; DINCKAYA, E.; TELEFONCU, A. *Pseudomonas putida* based amperometric

biosensors for 2,4-D detection. **Preparative Biochemistry Biotechnology**, v. 39, p. 11–19, 2009.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; SIMIONI, K. C. M.; SANTOS NETO, E. V. Bacterial diversity characterization in petroleum samples from Brazilian reservoirs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p. 445-452, 2008.

OLIVEIRA, Z. M. **Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de cana-de-açúcar sob biofertilização orgânica e/ou convencional**. 164p. Tese Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, São Paulo, 2009.

OLIVERA, S.; DUSICA, D.; DRAGANA, J.; DORDE, K.; NATASA, R.; JELENA, K. Improvement of common bean growth by co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, p. 5919-5926, 2011.

OVREAS, L.; JENSEN, S.; DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2739-2742. 1998.

PADILHA, G. S.; CASTIGLIONI, G. L.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B. Avaliação de diferentes íons na atividade da lipase de *Pseudomonas cepacia*. **Exacta**, v. 7, p. 181-186, 2009.

PALLERONI, N. J. Introduction to the family pseudomonadaceae. In: BALOWS, H.G., TRUPER, M.; DWORKIN, W.; HARDER, A.; SCHLIEFER, K. (Eds.), 2a ed. **The Prokaryotes**, vol. 3. Springer-Verlag, New York, pp. 3071– 3085, 1992.

PAN, B.; BAI, Y. M.; LEIBOVITCH, S.; SMITH, D. L. Plant-growth promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short – growing –season area. **European Journal of Agronomy**, v. 11, p. 179-186, 1999.

PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; OLIVEIRA, S. M. A. Ação antagônica de *Pseudomonasaeruginosa* a *Pseudomonassolanacearum* e efeito no desenvolvimento de plântulas de tomate. **Summa Phytopathologica**, v. 21, p. 219-224, 1995.

PEIXOTO, R.; CHAER, G. M.; CARMO, F. L.; ARAÚJO, F. V.; PAES, J. E.; VOLPON, A.; SANTIAGO, G. A.; ROSADO, A.S. Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, p. 341-354, 2011.

PHAM, T. H.; BOON, N.; De MAEYER, K.; HOFTE, M.; RABAEY, K.; VERSTRAETE, W. Use of *Pseudomonas* species producing phenazine-based metabolites in the anodes of microbial fuel cells to improve electricity generation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 985–993, 2008.

PIERSON, L. S.; PIERSON, E. A. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. **FEMS Microbiology Letters**, v. 136, p. 101–108, 1996.

PIETERSE, C. M. J.; van LOON, L. C. Salicylic acid independent plant defence pathways. **Trends Plant Science**, v.4, p.52–58, 1999.

PRADA-GAMERO, R. M. **Mineralogia, fisico-química e classificação dos solos de mangue do Rio Iriri no canal de Bertoga (Santos, SP)**. 76 f. Dissertação (M.S.) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

PRESTON, G. M.; BERTRAND, N.; RAINEY, P. B. Type III secretion in plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. **Molecular Microbiology**, v. 41, p. 999-1014, 2001.

PROSSER, J. I.; BOHANNAN, B. J. M.; CURTIS, T. P.; ELLIS, R. J.; FIRESTONE, M. K.; FRECKLETON, R. P.; GREEN, J. L.; GREEN, L. E.; KILLHAM, K.; LENNON, J. J.; OSBORN, A. M.; SOLAN, M.; Van DER GAST, C. J.; YOUNG, J. P. W. Essay - The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 384-392, 2007.

RAAIJMAKERS, J. M.; WELLER, D. M. Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp.: characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2545–2554, 2001.

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V.M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 997-1004, 2005.

RAMETTE, A.; FRAPOLLI, M.; SAUX, M.F.; GRUFFAZ, C.; MEYER, J.M.; DEFAGO, G.; SUTRA, L.; MOENNE-LOCCOZ, Y. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p.180-188, 2011.

RANGARAJAN, S.; LOGANATHAN, P.; SALEENA, L. M.; NAIR, S. Diversity of pseudomonads isolated from three different plant rhizospheres. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 742–749, 2001.

RAVIKUMAR, S.; RAMANATHAN, G.; SUBA, N.; JEYASEELI, L.; SUKUMARAN, M. Quantification of halophilic *Azospirillum* from mangroves. **Indian Journal of Marine Science**, v. 31, p. 157-160, 2002.

REIMMANN, C.; VALVERDE, C.; KAY, E.; HAAS, D. Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p.276–285, 2005.

REYES, L. F. **Diversidade de bactérias em manguezal e biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos**. 123f. Tese (Biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RIGONATO, J. **Diversidade de cianobactérias em manguezais do Estado de São Paulo**. 107 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

RIGONATO, J.; ALVARENGA, D. O.; ANDREOTE, F. D.; DIAS, A. C. F.; MELO, I. S. KENT, A.; FIORE, M. F. Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of a mangrove forest. **FEMS Microbiology Ecology**, 2012. DOI: 10.1111/j.15746941.2012.01299.x

ROJAS, A.; HOLGUIN, G.; GLICK.; B. R.; BASHAN, Y. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂ -fixer) and *Bacillus licheniformis* (P -solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, p. 181-187, 2001.

RONDON, M. R.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 403-409, 1999.

RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M. R.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; MACNEIL, I. A.; MINOR, C.; TIONG, C. L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M. S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2541-2547, 2000.

ROSENBERG, K.; BERTAUX, J.; KROME, K.; HARTMANN, A.; SCHEU, S.; BONKOWSKI, M. Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. **The ISME Journal**, v. 3, p. 675–684, 2009.

ROVIRA, A. D.; SANDS, D.C. Fluorescent Pseudomonads-a Residual Component in the Soil Microflora? **Journal of Applied Microbiology**, v. 34, p. 253–259, 1971.

RUDRAPPA, T.; CZYMMEK, K. J.; PARE, P. W.; BAIS, H. P. Rootsecreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. **Plant Physiology**, v. 148, p. 1547–1556, 2008.

RUSCH, D. B.; HALPERN, A. L.; SUTTON, G.; HEIDELBERG, K. B.; WILLIAMSON, S. et al. The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: Northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. **Public Library of Science Biology**, v. 5, p. 77, 2007.

RYCKEBOER, J.; MERGAERT, J.; COOSEMANS, J.; DEPRINS, K.; SWING, J. Microbiological aspects of biowaste during composting in monitored compost bin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 127-137, 2003.

SÁ, A. L. B. **Diversidade de bacterias endoglicolíticas isoladas de mangue vermelho (*Rhizophora mangle*)**. 60 f. Dissertação de mestrado (Biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SACHERER, P.; DÉFAGO, G.; HAAS, D. Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulator gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **FEMS Microbiology Letters**, v. 116, p. 155–160, 1994.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SALLES, J. F.; DE SOUZA, F. A.; van ELSAS, J. D. Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1595-1603, 2002.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; JUNIOR, C. C.; TOGNELA-DE-ROSA, M. **Manguezais**. São Paulo: Ática, 2001, 48 p.

SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.; BAKKER, P.; van PEER, R. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. **Plant and Soil**, v.129, p. 75-83, 1990.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SEBASTIANES, F. L. S. **Diversidade genética e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de manguezais do estado de São Paulo**. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências: Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SGROY, V; CASSÁN, F; MASCIARELLI, O; PAPA, M. F.; LAGARES, A.; LUNA, V. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 371-381, 2009.

SHAHAROONA, B.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A.; KHALID, A. Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 2971-2975, 2006.

SHARMA, A.; JOHRI, B. N.; SHARMA, A. K.; GLICK, B. R. Plant growth promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP(3) influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 887–894, 2003.

SINDHU, S. S.; DADARWAL, K. R. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. in chickpea. **Microbiological Research**, v. 156, p. 353–358, 2001.

SINSUWAN, S.; RODTONG, S.; YONGSAWATDIGUL, J. Characterization of Ca²⁺-activated cell-bound proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, p. 2166-2174, 2008.

SMITH, E. M.; KEMP, W. M. Planktonic and bacterial respiration along an estuarine gradient: responses to carbon and nutrient enrichment. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 30, p. 251–261, 2003.

SOARES, A.; GUIEYSSE, B.; DELGADO, O.; MATTIASSON, B. Aerobic biodegradation of nonylphenol by cold-adapted bacteria. **Biotechnological Letters**, v.25, p. 731-738, 2003.

SOGIN, M. L.; MORRISON, H. G.; HUBER, J. A.; WELCH, D. M.; HUSE, S. M.; NEAL, P. R.; ARRIETA, J. M.; HERNDL, G. J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 12115-12120, 2006.

SONNLEITNER, E.; HAAS, D. Small RNAs as regulators of primary and secondary of metabolism in *Pseudomonas* species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 63-79, 2011.

STACKEBRANDT, P. H. A.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 28, p. 335-336, 1994.

STROBEL, G. A. Bacterial phytotoxins. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, p. 205-224, 1977.

SUTRA, L.; RISÈDE, J.M.; GARDAN, L. Isolation os fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of banana plants antagonistic towards root necrosing fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 289-293, 2000.

SZABOLCS, I. Soils and salinisation. In: **Handbook of plant and crop stress** PESSARAKALI, M. New York: Marcel Dekker,1994, p.3-11.

TAKEDA, R. *Pseudomonas* pigments. Pyoluterin, a new chorine containing pigment produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **HakoKogakuZasshi**, v. 36, p. 281-290, 1958.

TAKETANI, R.G.; FRANCO, N. O.; ROSADO, A.S.; van ELSAS, J.D. Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. **Journal of Microbiology**, v. 48, p. 7–15, 2010.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAWARA, S.; MATSUMOTO, S.; HIROSE, T.; MATSUMOTO, Y; NAKAMOTO, S.; MITSUNO, M; KAMIMURA, T. *In vitro* antifungal synergism between pyrrolnitrin and clotrimazole. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 30, p. 202-210, 1989.

TELKE, A. A.; KALYANIA, D. C.; JADHAVA, U. U; PARSHETTIB, G. K.; GOVINDWARA, S. P. Purification and characterization of an extracellular laccase

from a *Pseudomonas* sp. LBC1 and its application for the removal of bisphenol A. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 61, p. 252–260, 2009.

Ter BRAAK, C. J. F.; SMILAUER, P. **CANOCO Reference Manual and User's Guide to Canoco for Windows: Software for canonical community ordination (version 4)**. Ithaca, NY: Microcomputer Power, 1998, 352 p.

THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Journal Bacteriology**, v. 170, p. 3499–508, 1988.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 1994.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, p. 19–26, 1994.

TIAN, Y.; LIU, H. J.; ZHENG, T. L.; KWON, K. K.; KIM, S. J.; YAN, C. L. PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, p. 707–715, 2008.

TORSVIK, V.; DAAE, F. L.; SANDAA, R. A.; OVREAS, L. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, v. 64, p. 53–62, 1998.

TUITE, J. **Plant pathological methods**. Minneapolis: Burgess, 1969. 239 p.

Van den BROEK, D.; CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular nature of spontaneous modifications in *gacS* which cause colony phase variation in *Pseudomonas* sp. PCL1171. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 593–600, 2005.

Van den BROEK, D.; CHIN-A-WOENG, T. F. C.; EIJKEMANS, K.; MULDER, I. H.; BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Biocontrol traits of *Pseudomonas* spp. are regulated by phase variation. **Molecular Plant Microbe Interact**, v. 16, p. 1003–1012, 2003.

Van LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453–483, 1998.

Van PEER, R.; SCHIPPERS, B. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 456–463, 1988.

Van RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; ANDRADE, J. C.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001, 285 p.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M. E.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 460-468, 2000.

VENTOSA, A.; NIETO, J. J.; OREN, A. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 504–544, 1998.

VERMA, J. P.; YADAV, J.; TIWARI, K. N. Application of *Rhizobium* sp. BHURC01 and plant growth promoting rhizobacteria on nodulation, plant biomass and yields of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Agricultural Research**, v. 5, p.148-156, 2010.

VLASSAK, K.; Van HOLM, L.; DUCHATEAU, L.; VANDERLEYDEN, J.; De MOT, R. Isolation and characterization of fluorescent *Pseudomonas* associated with the roots of rice and banana grown in Sri Lanka. **Plant and Soil**, v. 145, p. 51-63, 1992.

VOISARD, C.; KEEL, C.; HAAS, D.; DEFAGO, G. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **The EMBO Journal**, v. 8, p. 351-358, 1989.

Von GRAEVENITZ, A.; WEINSTEIN, J. Pathogenic significance of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 44, p. 265-273, 1971.

WHISTLER, C. A.; CORBELL, N. A.; SARNIGUET, A.; REAM, W.; LOPER, J. E. The two component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factors and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **Journal of Bacteriology**, v.180, p. 6635–6641, 1998.

WILLIS, D. K.; HOLMSTADT, J. J.; KINSCHERF, T. G. Genetic evidence that loss of virulence associated with *gacS* or *gacA* mutations in *Pseudomonas syringae* B728a does not result from effects on alginate production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1400–1403, 2001.

XU, F. Applications of oxidoreductases: Recent progress. **Industrial Biotechnology**, v. 1, p. 38–50, 2005.

XU, X. R.; LI, H. B.; GU, J. D. Metabolism and biochemical pathway of n-butyl benzyl phthalate by *Pseudomonas fluorescens* B-1 isolated from a mangrove sediment. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 68, p. 379-85, 2007.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: **Biological Nitrogen Fixation**. STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (eds.) New York: Chapman and Hall, 1992, pp. 43–86.

ZAGO, V. C. P.; De-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. ***Pseudomonas* spp. Fluorescentes – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola.**

Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. 32p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 127).

ZAHARAN, H.H.; MOHARRAM, A.M.; MOHAMMAD, H.A. Some ecological and physiological studies on bacteria isolated from salt affected soils of Egypt. **Journal of Basic Microbiology**, v. 32, p. 405-413, 1992.

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.

ZEHR, J. P.; WARD, B. B. Nitrogen cycling in the ocean: new perspectives on processes and paradigms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1015–1024, 2002.

ZHANG, Y.; DONG, J.; YANG, Z.; ZHANG, S.; WANG, Y. Phylogenetic diversity of nitrogen-fixing bacteria in mangrove sediments assessed by PCR–denaturing gradient gel electrophoresis. **Archives Microbiology**, v. 190, p. 19–28, 2008.

ZHANG,Y.; DONG, J.; YANG, B.; LING, J.; WANG, Y.; ZHANG, S. Bacterial community structure of mangrove sediments in relation to environmental variables accessed by 16S rRNA gene-denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. **Scientia Marina**, v. 73, p. 487-498, 2009.

ZHOU, H.W.; WONG; A.H.Y; YU, R.M.K.; PARK, Y.D.; WONG, Y.S.; TAM, N.F.Y. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Structural Shift of Bacterial Communities in Mangrove Sediment. **Microbial Ecology**, v.58, p.153–160, 2009.

ANEXO

ANEXO A – Caracterização de sequências de clones obtidas de sedimentos de manguezais do Estado de São Paulo

Clone	16S rRNA	Acesso	Similaridade%	Origem e/ou atividade	Referência
NCB.1	<i>P. aeruginosa</i>	EU131096	97,9	Degradadora de triadimefon	
NCB.2	<i>Pseudomonas</i> sp.	HQ652598	95,6	Drenagem de mina de magnetita	
NCB.3	<i>P. aeruginosa</i>	EU364810	87,4	Endofítica de mamão	
NCB.4	<i>P. nitroreducens</i>	AM088473	97,7		
NCB.5	Gama-proteobacteria	AY972868	93,8	Mar Báltico/ Fixadora de nitrogênio	BOSTRON et al., 2007
NCB.6	<i>Pseudomonas</i> sp.	DQ118954	93,9		
NCB.7	<i>P. nitroreducens</i>	AM088473	98,8		
NCB.8	<i>Pseudomonas</i> sp. não cultivada	FJ543080	96,4	Intestino de minhoca	RETTRAY et al., 2010
NCB.9	<i>Pseudomonas</i> sp.	HQ652598	98,3		
NCB.10	<i>P. fluorescens</i>	HQ880245	98,8	Isolada de salamandra <i>Andrias davidianus</i>	
NCB.11	sem similaridade				
NCB.12	<i>Pseudomonas</i> sp.	AB234289	99,0	Monoxigenase	IWAKI et al., 2006
NCB.13	<i>Pseudomonas</i> sp.	AJ278107		Fixadora de nitrogênio	
NCB.14	sem similaridade				
NCB.15	<i>Pseudomonas</i> sp.	FJ268963	95,5	Rizosfera de <i>Phragmites communis</i> em pantano	
NCB.16	<i>P. nitroreducens</i>	AM088473			
NCB.17	<i>Pseudomonas</i> sp.	AJ973279	93,5	Solo cultivado no Vietnã	
NCB.18	<i>Pseudomonas</i> sp.	FN652314	93,0	Compostagem	GIBELLO et al., 2011
NCB.19	<i>P. protegens</i>	AJ417072	97,9	Produtora de diacetilfluoroglucinol e pioluterina	RAMETTE et al., 2011
NCB.20	<i>Pseudomonas veronii</i>	AY179328.1	97,9	Degradadora de nonilfenol e adaptação ao frio	SOARES et al., 2003
NCB.21	<i>P. otitidis</i>	AY953147	97,3	Paciente com infecção	CLARK et al., 2006
NCB.22	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	AM922106.1	98,6	Degradadora de herbicida s-triazinas	
NCB.23	<i>P. mendocina</i>	FJ828886.2	98,0	Metilotrófica	HUNG et al., 2011
NCB.24	<i>P. nitroreducens</i>	JF513158	99,6	Tolerante a sal	
BC1.1	<i>P. psychrotolerans</i>	AJ575816	99,4		
BC1.2	<i>Pseudomonas</i> sp.	FR682932	95,4	Produção de biofilme e degradação de herbicida	VERAGEN et al., 2011
BC1.3	<i>P. migulae</i>	EU111725	95,6	Rizosfera de trigo	
BC1.4	<i>Pseudomonas</i> sp.	AY569287	96,9		
BC1.5	<i>Pseudomonas otitidis</i>	AY953147	99,0	Pacientes com infecção	CLARCK et al., 2006
BC1.6	<i>P. fluorescens</i>	HM016864	91,6	Degradadora de fenol	
BC1.7	<i>P. fluorescens</i>	DQ146946	97,7	Leite/ Produtora de exoproteases	
BC1.8	sem similaridade				

Continua...

Continuação

ANEXO A – Caracterização molecular de sequências de clones obtidas de sedimentos de manguezais do Estado de São Paulo

Clone	16S rRNA	Acesso	Similaridade%	Origem e/ou atividade	Referência
BC1.9	<i>P. trivialis</i>	DQ536516	99,4	Deserto do Himalaia / Solubilizadora de fosfato	GULATI et al., 2008
BC1.10	<i>Pseudomonas</i> sp.	AY940129	95,3	Microcosmo de sedimento de aquicultura	KIM et al., 2005
BC1.11	Bactéria não cultivada	FJ203036	95,3	Coral <i>Montrastaea faveolata</i>	SUNGAWA et al., 2009
BC1.12	<i>Oceanobacter</i> sp. não cultivada	DQ189779	99,0	Mar costeiro/ Dissolve compostos orgânicos	MOU et al., 2007
BC1.13	<i>P. cedrina</i>	AJ492830.1	98,5	Filosfera de gramíneas	
BC1.14	<i>P. nitroreducens</i>	JF513158	99,4	Tolerante a sal	
BC1.15	<i>P. nitroreducens</i>	AM922106	97,4	Degradadora de herbicida s-triazinas	
BC1.16	Bactéria não cultivada	JF741935	99,4	Reservatório de óleo	
BC1.17	<i>P. fluorescens</i>	HQ876462	93,4	RPCP	
BC1.18	<i>Pseudomonas</i> sp.	DQ339600	93,9	Endofítica de planta de montanha na China	SHENG et al., 2011
BC1.19	<i>P. fluorescens</i>	GU 198107	98,3	Rio Woluwe, Bélgica	
BC1.20	Bactéria não cultivada	FJ203036	95,0	Coral <i>Montrastaea faveolata</i>	
BC1.21	<i>P. nitroreducens</i>	AM922106	97,3	Degradadora de herbicida s-triazinas	
BC1.22	<i>Pseudomonas</i> sp. não cultivada	FJ268963	99,6	Rizosfera de <i>Phragmites communis</i> de pantano	
BC1.23	Pseudomonadacea	FJ543081	97,7	Intestino de minhoca	RETTRAY et al., 2010
BC1.24	<i>P. fluorescens</i>	HQ876462	94,4	RPCP	
BC1.25	Bactéria não cultivada	HM438580	93,8	Solo contaminado com antraceno	
BC2.1	<i>Pseudomonas</i> sp.	AM913898	97,5	Associada a alga marrom/Produtora de antibiótico	WIESE et al., 2009
BC2.2	<i>P. reactans</i>	AY747594	98,6		
BC2.3	sem similaridade				
BC2.4	Bactéria não cultivada	FJ849429	96,3	Mar Ártico	
BC2.5	Bactéria não cultivada	DQ990928	81,0	Deserto do Atacama	
BC2.6	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	EU312976	97,9	Degradadora de triadimefon	
BC2.7	<i>P. aeruginosa</i>	HM137028	98,3		
BC2.8	<i>P. aeruginosa</i>	HM137028	99,8		
BC2.9	<i>P. nitroreducens</i>	AM088473	98,0		
BC2.10	<i>P. resinovorans</i>	AB021373	98,6		
BC2.11	<i>Pseudomonas</i> sp.	FN429930	99,0	Compostagem	GIBELLO et al., 2011
BC2.12	<i>P. reinekei</i>	AM293565	99,0	Degradadora de clorosalicilatos	CAMARA et al., 2007
BC2.13	sem similaridade				
BC2.14	<i>P. nitroreducens</i>	AM922106.1	97,7	Degradadora de herbicida s-triazinas	Continua...

Continuação

ANEXO A – Caracterização molecular de seqüências de clones obtidas de sedimentos de manguezais do Estado de São Paulo

Clone	16S rRNA	Acesso	Similaridade%	Origem e/ou atividade	Referência
BC2.15	Bactéria não cultivada	GQ388991	94,6	Sistema de distribuição de água com <i>red water</i>	LI et al., 2010
BC2.16	<i>P. nitroreducens</i>	AM922106.1	99,2	Degradadora de herbicida s-triazinas	
BC2.17	Bactéria não cultivada	FJ813536	90,8	Lama de vulcão/ metanotrófica anaeróbica	LI et al., 2010
BC2.18	<i>P. nitroreducens</i>	AM922106.1	95,1	Degradadora de herbicida s-triazinas	
BC2.19	<i>P. chlororaphis</i>	HM241942.1	98,7	Endofítica de <i>Sophora alopecuroides</i> / RPCP	
BC2.20	Bactéria não cultivada	GQ389036	95,4	Sistema de distribuição de água com <i>red water</i>	
BC2.21	<i>Pseudomonas</i> sp.	DQ785814	99,6	Degradação de PNP	
BC2.22	sem similaridade				ZAHIR et al., 2006 KIM et al., 2005
BC2.23	sem similaridade				
BC2.24	<i>P. fluorescens</i>	DQ146946	98,8	Leite/ Produtora de exoproteases	
BC2.25	<i>P. reactans</i>	DQ257418	99,2		
CAN 1.1	<i>Pseudomonas</i> sp.	DQ113452	94,1	Tolerante a solvente orgânico	
CAN 1.2	<i>P. alcaligenes</i>	AY835998.1	97,3	Genes de poli-hidroxialcanoatos	
CAN 1.3	<i>P. putida</i>	EU179737	92,8		
CAN 1.4	<i>P. reactans</i>	DQ257418	98,5		
CAN 1.5	<i>P. fluorescens</i>	AY321588	97,9	Subsolo/ Mobilização de radionuclídeos	
CAN 1.6	<i>P. aeruginosa</i>	HM137028	98,7		
CAN 1.7	Bactéria não cultivada	FR684049		Oceano	
CAN 1.8	<i>P. cedrina</i>	LGM21467	98,3		
CAN 1.9	<i>P. fluorescens</i>	AY321588	99,0	Subsolo/ Mobilização de radionuclídeos	
CAN 1.10	sem similaridade				
CAN 1.11	<i>P. synxantha</i>	GU186110	96,7	Rizosfera de ervilha / Solubilizadora de fosfato	
CAN 1.12	<i>P. fluorescens</i>	GU198119	96,4	Rio Woluwe, Bélgica	
CAN 1.13	<i>P. fluorescens</i>	GU198119	87,6	Rio Woluwe, Bélgica	
CAN 1.14	Bactéria não cultivada	JN030726	94,2	Plataforma continental	
CAN 1.15	sem similaridade				
CAN 1.16	<i>Pseudomonas</i> sp.	EU099376	95,7	Bactéria resistente a herbicida sulfonilureias	
CAN 1.17	Bactéria não cultivada	AJ567576	93,0	Sedimento marinho	
CAN 1.18	<i>P. nitroreducens</i>	AM922106	97,1	Degradadora de herbicida s-triazinas	
CAN 1.19	<i>Pseudomonas</i> sp.	GQ214547	87,5		
CAN 1.20	<i>P. nitroreducens</i>	JF513151	97,9	Tolerante a sal	

Continua...

Conclusão

ANEXO A – Caracterização molecular de sequências de clones obtidas de sedimentos de manguezais do Estado de São Paulo

Clone	16S rRNA	Acesso	Similaridade%	Origem e/ou atividade	Referência
CAN 1.21	<i>Pseudomonas</i> sp.	AM111029	77,0	Sedimento do fundo do mar do Pacífico Leste	
CAN 1.22	<i>P. fluorescens</i>	HQ880245	96,2	Isolada de salamandra <i>Andrias davidianus</i>	
CAN 1.23	Bactéria não cultivada	JF428925	93,0	Solo rico em potássio	
CAN 1.24	<i>Pseudomonas</i> sp.	AM110968	90,3	Sedimento do fundo do mar do Pacífico Leste	
CAN 1.25	<i>Pseudomonas</i> sp.	AY689025	81,0	Resistente a antibióticos	

As siglas representam os manguezais amostrados de Bertioga não contaminado (NCB), Bertioga contaminado com óleo cru ponto 1 (BC1), Bertioga contaminado com óleo cru pontos 2 e 3 (BC2) e Cananéia (CAN).