

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

RENATA ASSIS CASTRO

**Estudo da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada
aos manguezais de Cananéia e Bertioga - SP**

Piracicaba

2011

RENATA ASSIS CASTRO

**Estudo da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada
aos manguezais de Cananéia e Bertioga - SP**

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Piracicaba

2011

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Castro, Renata Assis

Estudo da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada aos manguezais de Cananéia e Bertioga - SP / Renata Assis Castro; orientador João Lucio de Azevedo. - - Piracicaba, 2011.

91 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Bactérias 2. Cana-de-açúcar 3. Ecossistemas de mangue 4. Enzimas
5. Fixação de nitrogênio 6. Fosfatos 7. Hormônios vegetais 8. Microrganismos endofíticos I. Título

CDU 631.461.5+577.171.1

Dedico

A minha mãe Maria Júlia, que fez tudo para esta conquista.

A minha avó Iracema, que mesmo aos seus 95 anos me deu e dá forças para continuar a caminhada.

Ofereço

*Aos meus “presentes” Letícia e Laura e
ao meu esposo, pela alegria, carinho e
principalmente paciência.*

AMO VOCÊS

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. João Lúcio de Azevedo, pela honra de trabalhar ao seu lado, pela oportunidade e confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo: o que dizer á você... se estou escrevendo minha dissertação hoje é pela oportunidade, confiança, conselhos e motivação que você me deu. MUITO OBRIGADA...

Ao Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava, pela amizade, colaboração na execução deste trabalho.

A Prof^ª. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner pela amizade, apoio e colaboração profissional.

A Dra. Maria Carolina Quecine pela grande ajuda nas discussões, análises estatísticas deste trabalho, além da amizade e carinho.

Ao Zezo pela amizade e serviços técnicos prestados.

A empresa Bioflora que cedeu toda infra estrutura, mão de obra e as mudas de monjoleiro para a realização do experimento de promoção de crescimento vegetal.

A empresa CanaVialis pela doação de mudas de cana-de-açúcar para o experimento de promoção de crescimento vegetal.

A Dra. Aline Silva Romão pela grandiosa amizade e realizações de trabalhos.

A todos os amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos, pela amizade e convivência durante estes anos: seria difícil relatar o nome de todos sem me esquecer de alguém... A nossa amizade será guarda eternamente.

Ao Dr. Humberto (Beto) do Laboratório de Genética de Leveduras/ESALQ, pela amizade e disponibilização de equipamentos e material.

A Letícia (minha filha) e João Paulo (meu esposo) pela ajuda na montagem e coleta de dados nos experimentos de promoção de crescimento.

A Capes, CNPq e FAPESP pela concessão de bolsa e financiamento das pesquisas.

A todos os funcionários do CENA, que sempre se empenharam em me ajudar com tudo o que precisei nesta jornada.

A minha família e amigos que sempre me apoiaram nos momentos difíceis e riram comigo nas alegrias.

A Deus que me deu forças e coragem para levantar a cada vez que caí, que me fez acreditar que realizar sonhos é possível por mais que muitos digam não. E vejam só: hoje estou realizando meu maior sonho. Qual será o próximo? Hum....que venha o Doutorado!!!!

RESUMO

CASTRO, R. A. **Estudo da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada aos manguezais de Cananéia e Bertioga – SP.** 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

Os manguezais são ecossistemas encontrados na transição entre os ambientes terrestre e marinho apresentando uma biodiversidade funcional única e conseqüentemente flora e fauna específica. Por se tratar de um ambiente inóspito e pouco explorado é de grande importância o estudo desta comunidade a fim de se obter isolado com potencial biotecnológico. Sabe-se que tecidos vegetais são habitados por microrganismos denominados endofíticos, cuja interação com a planta hospedeira pode conferir características vantajosas ao mesmo. Este trabalho teve como objetivo estudar a comunidade bacteriana endofítica cultivável de manguezais, além de determinar a produção enzimática e a utilização de isolados na promoção de crescimento vegetal. Para tanto, foram coletadas amostras de ramo das espécies vegetais *Rhizophora mangle*, *Avicenia nitida*, *Laguncularia racemosa* para o isolamento de bactérias endofíticas. Os locais e épocas amostrados foram manguezais do litoral paulista em Bertioga (local com e sem impacto ambiental) e em Cananéia (local considerado preservado) durante o verão e inverno de 2007 e 2008. Foi obtido grande número de isolados em todos os locais e épocas avaliados, porém a análise estatística não apresentou diferença significativa entre as variáveis avaliadas, com exceção da planta *L. racemosa* no período do verão em Bertioga impactado a qual apresentou baixa freqüência. Dentre os isolados obtidos selecionou-se para estocagem aproximadamente 1000 isolados os quais foram submetidos a testes enzimáticos *in vitro* a fim de realizar uma triagem inicial. Destes, 75% apresentaram atividade para pelo menos uma das enzimas avaliadas. Selecionou-se então isolados com atividade enzimática para no mínimo três ou mais enzimas para testes mais específicos chegando a um número de 115 isolados. A identificação dos isolados foi realizada por seqüenciamento parcial do gene 16S rDNA. Dentre os isolados identificados, os gêneros mais freqüentes foram: *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Chryseobacterium*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erythrobacter*, *Exiguobacterium*, *Novosphingobium*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* entre outros. Os resultados demonstraram que dos isolados avaliados: 69% são produtores de fosfatase, 69% de protease, 60% de endoglicanase, 58% de lipase, 43% de amilase e 21% de esterase. Além destes resultados, dos 115 isolados avaliados, 35% apresentou a capacidade de sintetizar AIA (ácido indol acético) e 45% a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. Os isolados com os melhores resultados quanto a fixação de nitrogênio e síntese de AIA foram inoculados em plântulas de cana-de-açúcar e monjoleiro. Os experimentos foram desenvolvidos em casa de vegetação e em viveiro respectivamente. As bactérias selecionadas não promoveram o crescimento de cana-de-açúcar, sendo inclusive observado um crescimento superior da testemunha em relação aos tratamentos com inoculação bacteriana. Já com monjoleiro foi observado que o isolado de *Enterobacter* sp. apresentou aumento na massa da matéria fresca e seca da parte aérea e da raiz. Assim, os dados apresentados demonstraram potencial de aplicação das bactérias endofíticas isoladas dos manguezais brasileiro, tanto na busca de novos compostos,

como enzimas, para aplicação industrial, quanto no desenvolvimento de inoculantes visando a promoção de crescimento de espécies vegetais utilizadas na agricultura e reflorestamento.

Palavras-chave: AIA. Enzimas. Solubilização de fosfato. Fixação de nitrogênio. Promoção de crescimento.

ABSTRACT

CASTRO, R. A. **Study of cultivable endophytic bacterial community associated with mangrove Cananéia e Bertioga - SP.** 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

The mangrove is an ecosystem of transition between the terrestrial and marine environments, featuring a unique functional biodiversity, providing consequently a specific flora and fauna. Due to its inhospitable characteristics, few studies explore its very importance; the study of this community to get isolated with biotechnological potential. It is known that the plant tissues are inhabited by microorganisms known as endophytes and this interaction may confer advantages for both. The aim of this work was the evaluation of the potential of the mangrove endophytic bacteria to enzymatic production as well their potential to plant growth promotion. The bacterial endophytic isolates were obtained from branches from *Rhizophora mangle*, *Avicennia nitida* and *Laguncularia racemosa* mangrove species. The vegetal samples were collected in the mangroves at Bertioga (with and without environmental impact) and Cananéia (a preserved area) during two different times, summer and winter on 2007 and 2008. We obtained large numbers of isolates in all areas and times evaluated, but the statistical analysis showed no significant difference between the variables, except the plant *L. racemosa* in the summer, Bertioga – impacted area, that presented low frequency of isolation. Arbitrarily, 1000 were stored and all those evaluated to enzymatic production. Of these, 75% presented activity for at least one of the evaluated enzymes. It was selected 115 isolates that showed activity for at least three or more enzymes. The molecular identification of these isolates was performed by partial sequencing of the 16S rDNA. The predominant identified genera were: *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Chryseobacterium*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Erythrobacter*, *Exiguobacterium*, *Novosphingobium*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* and others. Among the evaluated isolates: 69% produce phosphatase, 69% produce protease, 60% produce endoglucanase, 58% produce lipase, 43% produce amylase and 21% produce esterase. Even, 35% and 45% are able to produce IAA and nitrogen fixation respectively. Isolates that showed good characteristics to IAA and nitrogen fixation were inoculated with sugar cane and monjoleiro (*Acacia polyphylla*) seedlings. All experiments were conducted in greenhouse. None selected bacteria promoted the sugar cane growth, being the development of control treatment better than bacterial inoculation. It was observed an increase in their fresh and dried biomass. Thus, the results show the huge potential of endophytic bacteria from mangrove to the discovery of new compounds, as enzymes, to industrial application and to the development of new inoculants aiming the plant growth promotion of agriculture and reforestation.

Keywords: IAA. Enzymes. Phosphate solubilization. Nitrogen fixation. Plant growth promotion.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Coleta de material vegetal em manguezal de Bertioga, SP, local considerado impactado pelo derramamento de óleo.....31
- Figura 2- Número de bactérias endofíticas presentes nos ramos de *R. mangle*, *L. rancemosa* e *A. nitida* em isolamento realizado durante o período de verão e inverno em Bertioga impactado. Os dados apresentados são a média de cinco repetições. Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P>0,05$) de acordo com o teste de Tukey.....40
- Figura 3- Número de bactérias endofíticas presentes nos ramos de *R. mangle*, *L. rancemosa* e *A. nitida* em isolamento realizado durante o período de verão e inverno em Bertioga não impactado. Os dados apresentados são a média de cinco repetições, tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P>0,05$) de acordo com o teste de Tukey.....41
- Figura 4- Número de bactérias endofíticas presentes nos ramos de *R. mangle*, *L. rancemosa* e *A. nitida* do isolamento realizado durante o período de verão e inverno em Cananéia. Os dados apresentados são a média de cinco repetições tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P>0,05$) de acordo com o teste de Tukey.....42
- Figura 5- Seleção *in vitro* bactérias endofíticas isoladas dos manguezais em placas de 96 poços, para produção enzimática: (A) amilase, (B) protease, (C) endoglicanase e (D) TSB 5%43
- Figura 6- Percentual de produção enzimática das bactérias endofíticas isoladas do manguezal impactado por derramamento de óleo em Bertioga obtidas de três plantas *R. mangle*, *L. rancemosa*, *A. nitida* e em duas épocas: verão e inverno.....44
- Figura 7- Percentual de produção enzimática das bactérias endofíticas isoladas do manguezal não impactado em Bertioga obtidas de três plantas *R. mangle*, *L. rancemosa*, *A. nitida* e em duas épocas: verão e inverno45
- Figura 8- Percentual de produção enzimática das bactérias endofíticas isoladas do manguezal de Cananéia obtidas de três plantas *R. mangle*, *L. rancemosa*, *A. nitida* e em duas épocas: verão e inverno.47
- Figura 9- Produção enzimática por bactérias endofíticas isoladas de espécies vegetais do manguezal. A formação de halo indica a produção enzimática *in vitro*. A: protease; B: amilase, C: esterase; D: lípase; E: fosfatase e F: endoglicanase48
- Figura 10- Percentual de isolados endofíticos de plantas de manguezal com capacidade de fixar nitrogênio.....49

Figura 11- Modificação do meio de cultura NFb semi-sólido do pH básico (controle) para o pH ácido mostrado pelo isolado MCA 2.39 (Tabela 8)	50
Figura 12- Fixação de nitrogênio, <i>in vitro</i> , por bactérias endofíticas do mangue. Formação de halo e mudança de cor no meio de cultura NFb semi-sólido	50
Figura 13- Fixação de nitrogênio, <i>in vitro</i> , por bactérias endofíticas de manguezal. Formação de halo no meio de cultura NFb semi-sólido sem alteração do pH.....	50
Figura 14- Percentual de isolados endofíticos de plantas de manguezal com capacidade de produzir AIA.....	51
Figura 15- Curva padrão com diferentes concentrações de AIA comercial.....	52
Figura 16- Experimento em viveiro na empresa Bioflora com plântulas de monjoleiro	66
Figura 17- Plântulas de monjoleiro para avaliação da massa fresca e seca	66
Figura 18- Plântulas de cana-de-açúcar para avaliação de massa fresca e seca A: Testemunha e tratamento 1 – B: Testemunha e tratamento 3 – C: Testemunha e consórcio – D: Testemunha e tratamento 4.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Pontos de coletas das espécies vegetais nos manguezais.....	30
Tabela 2- Números de isolados bacterianos endófitos selecionados para os testes enzimáticos em relação às variáveis planta, local e época	43
Tabela 3- Percentual enzimático dos isolados obtidos em Bertioga impactado	44
Tabela 4- Percentual enzimático dos isolados obtidos em Bertioga não impactado	45
Tabela 5- Percentual enzimático dos isolados obtidos em Cananéia	46
Tabela 6- Identificação, distribuição dos isolados em relação à produção de enzimas, AIA, fixação de N ₂ e IS para fosfatase em Bertioga não impactado.....	54
Tabela 7- Identificação, distribuição dos isolados em relação à produção de enzimas, AIA, fixação de N ₂ e IS para fosfatase em Bertioga impactado.....	57
Tabela 8- Identificação, distribuição dos isolados em relação à produção de enzimas, AIA, fixação de N ₂ e IS para fosfatase em Cananéia	59
Tabela 9- Bactérias endofíticas isoladas de manguezal com potencial biotecnológico selecionadas para o teste de promoção de crescimento.....	62
Tabela 10- Efeito da inoculação no solo de bactérias endofíticas isoladas de manguezal no desenvolvimento de plântulas de cana-de-açúcar após 45 dias.....	64
Tabela 11- Efeito da inoculação no solo de bactérias endofíticas isoladas de manguezal no desenvolvimento de plântulas de monjoleiro após 60 dias.....	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. O manguezal e sua importância	19
2.2. O papel dos microrganismos associados a plantas de mangue	20
2.3. Microrganismos endofíticos	21
2.4. Benefícios das bactérias endofíticas aplicadas na agricultura	22
2.5. Produção de reguladores de crescimento vegetal	26
2.5.1. Bactérias fixadoras de nitrogênio	26
2.5.2. Solubilização de fosfato	27
2.5.3. Produção de fitohormônios	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Locais de coletas	30
3.2. Isolamento bacteriano	31
3.2.1. Isolamento e estocagem das bactérias endofíticas de <i>R. mangle</i> , <i>L. racemosa</i> e <i>A. nítida</i>	31
3.3. Produção enzimática	32
3.3.1. Produção de celulase (endoglicanase)	32
3.3.2. Produção de amilase	33
3.3.3. Produção de protease	33
3.3.4. Produção de lipase	33
3.3.5. Produção de esterase	33
3.3.6. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico	34
3.4. Seleção de bactérias com capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN)	34
3.5. Seleção de bactérias produtoras de Ácido Indol Acético (AIA)	35
3.6. Identificação dos isolados produtores de enzimas por seqüenciamento do gene 16S rDNA	35
3.7. Promoção de crescimento vegetal por bactérias endofíticas isoladas de manguezal	37
3.7.1. Promoção de crescimento de cana-de-açúcar	37
3.7.2. Promoção de crescimento em planta de monjoleiro	38
3.8. Análise estatística	39

4. RESULTADO	40
4.1. Isolamento bacteriano	40
4.2. Produção enzimática	42
4.2.1. Bactérias utilizadas para verificação de sua produção enzimática.....	42
4.2.2. Avaliação qualitativa de atividades enzimáticas produzidos por isolados bacterianos.....	42
4.2.2.1. Atividade enzimática na localidade de Bertioga	44
4.2.2.2. Avaliação enzimática em Bertioga não Impactado	45
4.2.2.3. Avaliação enzimática em Cananéia.....	46
4.2.2.4. Análise da produção de enzimas mediante aos resultados de índices enzimáticos	47
4.2.2.5. Seleção de bactérias com capacidade de fixação de nitrogênio por meio de seu crescimento em meio de cultura livre de nitrogênio.....	48
4.2.2.6. Seleção de bactérias produtoras de Ácido Indol Acético (AIA)	51
4.3. Identificação dos isolados por seqüenciamento do gene 16S rDNA	53
4.4. Avaliação de promoção de crescimento vegetal por bactérias endofíticas ...	61
4.4.1. Avaliação de promoção de crescimento em cana-de-açúcar	63
4.4.2. Avaliação de promoção de crescimento em monjoleiro	65
5. DISCUSSÃO	69
5.1. Número e diversidade de bactérias isoladas dos manguezais do estado de São Paulo	69
5.2. Produção de enzimas por bactérias endofíticas isoladas de plantas de manguezal.....	71
5.3. Fixação de N ₂ por bactérias endofíticas isoladas de manguezal	73
5.4. Produção de AIA por bactérias endofíticas isoladas de manguezal	74
5.5. Produção de crescimento vegetal	75
5.5.1. Promoção de crescimento em cana de açúcar	76
5.5.2. Promoção de crescimento em monjoleiro	77
6. CONCLUSÕES	79
REFERENCIAS	80

1. INTRODUÇÃO

O Manguezal é um ecossistema formado em regiões de interação entre o ambiente terrestre e o oceano, ou seja, zonas entre marés dos litorais, ilhas, baías e lagunas que apresenta características particulares como: salinidade (5% a 90%) e baixo teor de oxigênio. Além dessas características, as florestas de mangue variam segundo a latitude, meio físico, hidrografia e atmosfera, garantindo uma ampla variedade botânica e zoológica. São encontrados cerca de 60 tipos de árvores onde as principais representantes são: o mangue vermelho (*Rhizophora mangle*), o mangue Siriba (*Avicenia nitida*) e o mangue branco (*Laguncularia racemosa*). Destaca-se que, esse ecossistema pode ser encontrado pelo mundo inteiro, tanto em regiões que apresentem climas tropicais como subtropicais.

O Brasil possui uma das maiores extensões de manguezais do mundo, podendo ser encontrado ao longo de todo seu litoral, desde o Cabo Orange no Amapá, até o município de Laguna em Santa Catarina, abrangendo uma área de 25.000 Km².

O manguezal possui um papel fundamental na manutenção da biodiversidade marinha, funcionando como berçário e fonte de alimento para peixes e outros animais. Tal importância se deve principalmente pela ciclagem dos nutrientes devido ao aporte de materiais sedimentares provenientes tanto do mar quanto do continente, tornando-o um ambiente de transição de alta produtividade. Apesar das características de um ambiente inóspito, o manguezal é considerado um ecossistema vulnerável devido à crescente destruição desta área para construção civil, extrativismo vegetal e animal, portuária, barragens, derramamento de óleo dentre outras. Assim, a biota do manguezal vem sofrendo grande impacto, resultando em alterações no perfil de espécies, sejam elas vegetais, animais ou microbianas.

O solo e sedimento de ecossistemas estuarinos apresentam grande diversidade de microrganismos ainda não estudados. Sua caracterização genética e funcional é fundamental para o entendimento de processos biogeoquímicos nestes ambientes, assim como para a descoberta de novos genes com potencial biotecnológico.

Infelizmente, a manutenção e a renovação desse ecossistema através do reflorestamento parece ser uma realidade distante. Assim, a utilização de microrganismos na recuperação de manguezais e outros ecossistemas poderia ser uma alternativa viável. Várias espécies de bactérias endofíticas têm a capacidade de auxiliar no crescimento da planta hospedeira podendo contribuir significativamente para o reflorestamento dos manguezais. Dentre as atividades responsáveis por esta promoção de crescimento podem ser citadas a solubilização de fosfato, produção de fito-hormônio e a fixação biológica de nitrogênio.

Outro fato a ser abordado é que, com a redução da área de manguezais além das perdas de inúmeras espécies de flora e fauna, muitas espécies de microrganismos foram e estão sendo perdidas. Muitas destas, provavelmente nunca foram descritas às quais poderiam ser utilizadas na área biotecnológica, farmacêuticas e afins. Assim, a descrição do papel de diversidade e da comunidade microbiana em manguezais é um assunto de relevante importância, pois poucos são os estudos realizados com microrganismos deste ecossistema, tornando imperativa a descrição desta microbiota e a possível utilização desses microrganismos nas áreas citadas acima.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo contribuir para o estudo da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada a manguezais do estado de São Paulo bem como seu potencial biotecnológico enzimático como: produção de enzimas, capacidade de produção de auxina, fixação de nitrogênio e o potencial de promoção de crescimento vegetal em plântulas de cana-de-açúcar e de monjoleiro. Para isso, foram estudadas três áreas de manguezal: duas áreas em Bertioga, uma com impacto ambiental causado pelo derramamento de óleo e outra área considerada preservada; e a terceira área localizada em Cananéia considerada sem impacto ambiental.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O manguezal e sua importância

As regiões costeiras do planeta abrigam a maioria dos ecossistemas considerados altamente produtivos. Considerados peças-chaves, os recifes de corais e manguezais, são sistemas singulares e extremamente produtivos em relação aos recursos naturais renováveis além de serem considerados importantes para turismo e fontes de produtos diversos (ZHOU et al., 2006).

Os manguezais são ecossistemas costeiros tropicais que abrigam depósitos sedimentares formados por vasas lamosas, argilosas ou arenosas, ocupando a faixa entre marés. Condições extremas são encontradas nesse local tais como: salinidade elevada, influência das marés, ventos fortes, temperaturas altas, sedimentos lodosos e anaeróbios (FELLER; SITNIK, 1996; KATHIRESAN; BINGHAM, 2001). A este tipo de ambiente (halófilo), associa-se uma cobertura vegetal típica, caracterizada por espécies arbóreas com características peculiares.

No mundo, o Brasil, a Indonésia e a Austrália são os países com maior extensão de área deste tipo de ecossistema. Na América Latina, encontram-se cerca de 400.000 hectares de manguezal (HOLGUIN et al., 2001). Sua presença ocorre ao longo do litoral, desde o Cabo Orange no Amapá, até o município de Laguna em Santa Catarina, abrangendo uma área de 25.000 Km². No estado de São Paulo são encontrados cerca de 231 Km² de manguezal (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000).

A vegetação dos manguezais é composta principalmente pelas espécies: mangue vermelho (*Rhizophora mangle*), mangue preto ou Siriúba (*Avicenia nitida*) e o mangue branco ou tinteiro (*Laguncularia racemosa*) (CURY, 2002; LACERDA, 2003). Essa vegetação pode influenciar nas estruturas das comunidades microbianas nesse ambiente.

Os solos dos manguezais são formados pela deposição de partículas orgânicas e inorgânicas de origem terrígena e marinha que se movimentam em função das correntes das marés, podendo apresentar características diferentes devido à variação na intensidade de geração e do transporte deste material (WOODHOSE et al., 1974; VANNUCCI, 1999; STRALHER; STRALHER, 2000), bem

como em função das variações climáticas e atividades de fauna e flora (FERREIRA, 2006).

Ecologicamente, a importância do manguezal consiste em manter a base alimentar da cadeia trófica marinha e adjacentes evitando a erosão do solo devido às marés, reduzindo o assoreamento dos portos e diminuindo os impactos decorrentes da lixiviação de compostos químicos (EYSINK; POFFO, 2002). Ressalta-se também sua contribuição sócio-econômica, pelo benefício direto e indireto da produtividade pesqueira (peixes, camarões, caranguejos, ostras), para as populações que dependem deste ecossistema.

A manutenção das florestas de manguezal é um desafio de grande importância sócio-econômica para a maioria dos países tropicais. Somente nos últimos 50 anos, aproximadamente um terço das florestas de mangue foram perdidas (ALONGI, 2002).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são os principais elementos responsáveis pela poluição encontrada em manguezais de todo o planeta. A principal fonte de contaminação por estes compostos são derramamento de petróleo e descargas ilegais de efluentes (esgoto doméstico, por exemplo) (TAM et al., 2002). Em Bertioga – SP ocorreu o vazamento de um dos oleodutos da Petrobrás em 1983. Após mais de vinte anos do desastre, os efeitos deixam claro a modificação na flora daquela região (CURY, 2002). Recentemente, houve o maior desastre ambiental da história dos EUA, por derramamento de óleo no fundo do oceano no Golfo do México que durou mais de 40 dias sem solução imediata, causando danos irreparáveis à biota marinha e adjacentes.

2.2 O papel dos microrganismos associados a plantas de mangue

Em todo planeta os microrganismos representam a forma de vida mais diversificada e abundante (WHITMAN et al., 1998). Porém, a diversidade dos ecossistemas vem diminuindo devido à ação do homem, acarretando em extinção de espécies microbianas essenciais na manutenção destes ambientes e resultando em desequilíbrio ecológico (AZEVEDO, 1998). A existência e diversidade dos seres vivos no planeta estão intimamente ligadas á diversidade e a atividade metabólica de microrganismos na natureza (TRUPER, 1992). O papel dos microrganismos na

preservação dos processos biológicos como ciclagem de matéria orgânica, ciclos biogeoquímicos, manutenção e fertilidade de solos já são conhecidos e comprovados.

Em manguezais, bactérias e fungos constituem 91% da biomassa microbiana total, considerando que algas e protozoários representam apenas 7% e 2% respectivamente (ALONGI, 1988; BANO et al., 1997). A comunidade microbiana diversa e altamente produtiva vivendo em manguezais tropicais transforma continuamente a vegetação morta em fontes de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes que podem ser usados pelas plantas. Em troca, exsudados de raízes servem como fonte de alimentação para esses microrganismos.

2.3 Microrganismos endofíticos

Os microrganismos endofíticos foram descritos pela primeira vez por Bary (1866), citado por Azevedo (1998) e Peixoto-Neto et al. (2002), porém por mais de meio século estes microrganismos foram praticamente ignorados. Contudo, nos anos 70, vários estudos demonstraram a interação mutualística entre endófitos e plantas. A partir de então, começou-se a avaliar qual o papel biológico exercido por esses microrganismos, visando sua aplicação biotecnológica.

Endófitos são aqueles microrganismos que colonizam o interior das plantas sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais saudáveis como folhas, ramos e raízes, sem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO; ARAUJO, 2007). Dessa forma, são excluídos os fungos micorrízicos, bactérias simbióticas nodulantes, microrganismos epifíticos e patogênicos. Essa comunidade endofítica é constituída principalmente por fungos e bactérias, e ao contrário dos microrganismos patogênicos, não causa prejuízos a planta hospedeira (PEIXOTO-NETO et al., 2002). MENDES et al. (2007) propuseram a redefinição do termo “microrganismos endofíticos”, considerando a definição anterior, porém acrescentando divisões: Tipo 1 – os que não produzem estruturas externas a planta; e tipo 2 - aqueles que produzem estruturas externas a planta.

Até o momento, em todas as plantas estudadas, pelo menos um endófito é encontrado (STROBEL et al., 2004). A presença de endófitos já foi observada em inúmeras espécies vegetais de interesse econômico, entre elas destacam-se:

beterraba (BUGBEE et al., 1975; JACOBS et al., 1985), algodão (MISAGHI e DONNDELINGER, 1990), cana-de-açúcar (BODDEY et al., 1991), banana (PEREIRA et al., 1999), milho (ARAÚJO et al., 2000), citros (ARAÚJO et al., 2001), soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005) e eucalipto (PROCÓPIO, 2004; FERREIRA et al., 2008), dentre muitas outras culturas.

Apesar de sua importância e de sua alta diversidade, pouco se conhece sobre esta diversidade e densidade de bactérias endofíticas nos diferentes tecidos vegetais (POLYMENAKOU et al., 2005; MARTINY et al., 2006). Estudos vêm sendo realizados em diversas plantas, demonstrando que estas comunidades variam espacialmente nos vegetais. Esta relação pode estar ligada diretamente na dependência da interação com outras bactérias endofíticas ou patogênicas, assim como ao genótipo do hospedeiro e de fatores ambientais (STURZ et al., 1997; MOCALI et al., 2003).

Recentes estudos comprovaram que mesmo plantas cultivadas em cultura de tecidos, apresentam microrganismos endofíticos (ABREU-TARAZI et al., 2010). Conseqüentemente, a oportunidade de encontrar um novo e benéfico microrganismo endofítico entre a diversidade de plantas existentes nos diferentes ecossistemas terrestres é considerável (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

2.4 Benefícios das bactérias endofíticas aplicadas na agricultura

As plantas desenvolvem sistemas diversificados que permitem resistir a patógenos devido ao acúmulo de moléculas no local de infecção, e entre estes componentes, estão às enzimas hidrolíticas e fitoalexinas que podem prevenir o crescimento de patógenos. A produção destas substâncias com ampla ação antimicrobiana pode ser induzida por metabólitos produzidos por patógenos ou microrganismos associados. Esta indução pode ser devido à síntese de celulases por parte destes microrganismos durante o processo de infecção, ativando o sistema de defesa da planta limitando assim o desenvolvimento do patógeno (HALLMANN et al., 1997).

O controle biológico pode ocorrer de maneira direta pelas bactérias endofíticas, como exemplo, a produção de proteases, quitinases, e glicanases, que estão

envolvidas na degradação de paredes celulares de fungos patogênicos (STURZ et al., 2000; DOBBELAERE et al., 2003).

Os agentes e as formas de aplicações para o controle biológico de pragas e doenças são muitos, destacando-se: a competição por colonização e exudatos liberados pelas raízes, produção de compostos químicos como biocidas voláteis, enzimas líticas (GAI et al., 2009).

Para avaliar microrganismos com potencial para o controle biológico de patógenos é necessário o seu isolamento. A busca de linhagens para o controle biológico pode resultar no conhecimento de novas espécies de microrganismos. Neste contexto, o isolamento de bactérias associadas aos manguezais, com atividade antagonista, pode revelar novas espécies dentro dos gêneros bacterianos mais comumente estudados no controle biológico de fitopatógenos.

Bactérias endofíticas podem contribuir para o crescimento e desenvolvimento vegetal. A promoção de crescimento vegetal por bactérias pode ser resultado tanto de ações indiretas, como o controle biológico por competição de nutrientes, produção de sideróforos, antibiose e indução de resistência sistêmica no hospedeiro (STURZ et al., 1998; STURZ et al., 2000), quanto de ações diretas, como disponibilização de nutrientes para a planta, fixação de nitrogênio atmosférico e a produção de reguladores de crescimento vegetal, como auxinas (CHANWAY, 1998; SHISHIDO et al., 1999; STURZ et al., 2000). Este processo, no entanto, pode ser influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos. Logo, o estudo da comunidade microbiana relacionada à promoção de crescimento, é de suma importância para a contribuição de conhecimento sobre os processos de interação planta – microrganismo, visando maior utilização destes benefícios para áreas biotecnológicas e agrícolas.

Estudos recentes têm mostrado que bactérias também podem aumentar o crescimento vegetal de diversas culturas de interesse, entre elas batata (FROMMEL et al., 1991), milho (HINTON; BACON, 1995), pepino (RAUPACH; KLOEPPER, 1998), arroz (HUREK et al., 1994; PRAYITHO et al., 1999), melancia (LIU et al., 1995), soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005), eucalipto (PROCÓPIO, 2004; FERREIRA, 2008).

Do ponto de vista biotecnológico, bactérias que possuem mais de uma característica para a promoção de crescimento vegetal, como, por exemplo, fixar nitrogênio e solubilizar fosfato ou produzir auxina e sideróforos, entre outras, são

almejadas e rastreadas para uma possível aplicação no campo objetivando o aumento de produção agrícola (VERMA et al., 2001). Provavelmente as interações entre espécies de manguezais e bactérias são benéficas e podem suportar o uso de microrganismos como inoculantes para reflorestamento de manguezais e outros biomas, parcialmente ou completamente destruídos, bem como para aplicação em culturas de interesse agrícola.

As bactérias endofíticas possuem a capacidade de penetrar na planta e colonizar sistematicamente o hospedeiro (MAHAFFEE et al., 1997; QUADT-HALLMANN et al., 1997). Devido esta colonização sistêmica da planta, essas bactérias podem alterar as condições fisiológicas do hospedeiro, além de atuar sobre as populações de outros microrganismos presentes no interior da planta. A penetração de endófitos na planta é relatada principalmente via raiz, contudo, partes aéreas das plantas podem ser suscetíveis á penetração por endófitos. Dentro da planta, as bactérias endofíticas podem ser localizadas no ponto de entrada ou dispersa de forma sistêmica (HALLMANN et al., 1997). Elas penetram nos tecidos através de reações enzimáticas como celulase além de usarem aberturas naturais ou provocadas. Sua dispersão pode ser por sementes e propagação vegetativa, dentre outras (BALDANI, 1997).

Muitas pesquisas sobre produtos naturais têm sido voltadas ao isolamento de microrganismos endofíticos visando, principalmente, a descoberta de novas moléculas resultante do metabolismo primário e secundário dos mesmos. Dado o potencial biotecnológico dos microrganismos, esforços na busca de isolados resultando no encontro de novas moléculas, tais como antibióticos, enzimas e outras vêm aumentando cada vez mais.

As enzimas são os produtos microbianos mais explorados por indústrias biotecnológicas, pois em relação a produtos similares de origem vegetal e/ou animal, os de origem microbiana apresentam menor custo, facilidade para produção em fermentadores industriais, amplo espectro de características físico-químicas desejáveis (as quais, estejam relacionadas ao habitat e fisiologia do microrganismo produtor), susceptibilidade de manipulação genética, além de representarem um recurso renovável.

A utilização de enzimas tais como amilases, lípases, proteases, celulasas, dentre outras, é bastante ampla nas indústrias de alimentos, bebidas, farmacêutica, têxtil e no tratamento de resíduos. Assim sendo, estudos com enzimas vem

crescendo e moléculas com maior eficiência têm sido obtidas principalmente de microrganismos (CHANDRASEKARAN, 1997). Como exemplo nas células vegetais, o amido é um polissacarídeo de reserva energética e muitos microrganismos produzem amilases, que degradam esse polímero em moléculas de glicose diretamente utilizáveis nas atividades metabólicas celulares (PASCHOLATI, 1995). Sua aplicação industrial pode servir como aditivos em detergentes, na sacarificação de amido e nas indústrias de alimentos, fermentação, papel e têxtil. Assim, a busca de microrganismos amilolíticos se justifica pelo amplo espectro de utilização de amilases em várias áreas industriais.

As lípases e esterases constituem um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e a hidrólise dos lipídeos. São amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos animais e vegetais e, também, em células de microrganismos (REED, 1975). As enzimas lipolíticas constituem, atualmente, importantes grupos de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas (JAEGER; EGGERT, 2002).

As principais aplicações envolvem a produção de detergentes, produção de laticínios, processamento de óleos, biotransformações, produtos farmacêuticos, produção de agroquímicos, pesticidas e inseticidas (JAEGER et al., 1997). Espécies de *Bacillus* e uma variedade de gêneros tais como *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* e *Acinetobacter* têm se destacado na produção de lípases (SHARMA et al., 2001).

As proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas e participam em inúmeros processos fisiológicos com várias aplicações nas indústrias de detergente e de alimentos. Com intuito de diminuir a quantidade de poluentes relacionados ao tratamento de couro, a utilização de proteases vem sendo uma saída “ambiental” na substituição da utilização de compostos tóxicos e poluentes (RAO et al., 1998). As proteases originadas de microrganismos têm gerado maior interesse pelas indústrias, uma vez que, seu processamento pode ser realizado em grande escala no laboratório.

Considerando que o sucesso da descoberta de novos produtos consiste, principalmente, em obter e descrever novos microrganismos torna-se imprescindível sua busca em ambientes e condições ainda pouco explorados (AZEVEDO, 1998).

2.5. Produção de reguladores de crescimento vegetal

2.5.1. Bactérias fixadoras de nitrogênio

A disponibilização de nitrogênio fixado é o ponto crítico no rendimento de determinadas culturas na produção agrícola. A grande utilização de produtos agroquímicos nitrogenados, como fertilizantes, nas culturas agrícolas chega a mais de 30% (MUTHUKUMARASAMY et al., 2002). Com o elevado aumento no custo de fertilizantes, a preocupação da sociedade com os danos provocados pela utilização de insumos agrícolas, o papel da fixação biológica do nitrogênio é de grande importância para uma agricultura sustentável.

As bactérias diazotróficas utilizam o nitrogênio gasoso (N_2) da atmosfera para seu metabolismo. O N_2 é pouco reativo e somente algumas espécies de microrganismos procarióticos possuem o complexo enzimático necessário para transformá-lo em amônia que é subsequente assimilada em aminoácidos e proteínas. Este processo é chamado fixação biológica de N_2 (FBN) (NEVES; RUMJANEK, 1998; ZEHR et al., 2003). A FBN é a maior responsável pelo aporte de nitrogênio nos sistemas biológicos, contribuindo com 65% do nitrogênio fixado (NEWTON, 2000).

Freqüentemente o grupo *Rhizobiaceae* é o mais citado, um dos mais explorados e o primeiro a ser lembrado quando o assunto é promoção de crescimento vegetal por bactérias. Entretanto, outros grupos bacterianos têm apresentado importante ação na promoção de crescimento vegetal. Trabalho realizado por BAI et al., 2002 com grupo de *Bacillus* associado com *Bradyrhizoiium japonicum*, promoveram aumento na nodulação, raiz e biomassa em soja. Trabalhos realizados com *Pseudomonas* e *Bacillus* em tomate, quiabo e espinafre africano, demonstraram aumento na biomassa seca das plantas testadas, não apresentando diferença significativa entre as bactérias utilizadas (ADESEMOYE et al., 2008).

Sabe-se que a fixação do nitrogênio por microrganismos diazotróficos endofíticos tem sido pouco abordada e que os endófitos possuem algumas vantagens em relação ao simbiote de leguminosas. Estes ocupam espaços mais intimamente ligados ao hospedeiro, logo, tem maior acesso a substâncias importantes para o desenvolvimento vegetal. Em muitos casos participam de

reações químicas com o hospedeiro mantendo uma interação planta-microrganismo onde recebem e transferem com eficiência vários compostos. Esta eficiência é resultante do nicho onde são encontrados, por exemplo, a nitrogenase ficando protegidos de oxigênio (DOBBELAERE et al., 2003).

2.5.2 Solubilização de fosfato

Um dos principais fatores envolvidos no crescimento vegetal é a disponibilidade de nutrientes. Muitos solos são deficientes de fósforo (P) na forma disponível para as plantas (fósforo livre), mesmo em solos férteis a concentração é baixa, ainda que o P esteja mais solúvel (BARROTI; NAHAS, 2000; GYANESHWAR et al., 2002). Nos solos brasileiros a carência deste nutriente é compensada pela utilização de fosfatos solúveis, geralmente em dosagens muito altas, pois a maior parte não é prontamente absorvida pelas plantas. Por meio de vários processos biogeoquímicos o P se torna disponível para as plantas, sendo que uma das maneiras é a dissolução do fosfato (WITHEWLAW, 2000). É o nutriente mais limitante no crescimento vegetal, apesar de ser encontrado em larga escala na forma orgânica e inorgânica. Sua função além de estrutural e funcional é imprescindível na transferência de energia. O fósforo é o segundo nutriente essencial ao desenvolvimento vegetal, é o principal componente de lecitina e nucleotídeos, entre outros, estando também relacionado aos fenômenos de armazenamento e transferência de energia na planta, sob a forma de ATP (FORNASIERI FILHO, 1992). Ele deve ser hidrolisado para a forma inorgânica tornando-se disponível para as plantas, processo este mediado por enzimas, as fosfatases (GYANESHWAR et al., 2002).

Neste contexto, vários estudos têm sido realizados com a finalidade de avaliar microrganismos com capacidade de solubilizar composto de fosfato inorgânico. Entre os gêneros com essa capacidade estão: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (RODRIGUES; FRAGA, 1999).

Portanto, a capacidade das bactérias endofíticas em solubilizar fosfato inorgânico tem sido alvo de grande interesse por parte dos microbiologistas agrícolas, pois esta característica apresenta um grande potencial para a promoção de crescimento vegetal.

2.5.3 Produção de fitohormônios

Os hormônios vegetais são reguladores naturais de crescimento das plantas, influenciando os processos fisiológicos em baixas concentrações. Eles podem ser classificados como citocininas, giberelinas, etileno e auxinas.

Estudos fisiológicos sugerem que ligações entre fitohormônios, apresentam funções de modulação através dos níveis de auxina encontrados (DEMASON, 2005).

As citocininas são conhecidas por estimularem a divisão celular (citocinese). São produzidas nas raízes e através do xilema são transportadas para toda planta. Atuam também na associação com auxina no controle da dominância apical, retardam o envelhecimento das plantas e sua interação com auxina pode induzir o desenvolvimento *in vitro* da raiz (SKOOG; MOLEIRO, 1957). Os níveis de auxina e de citocininas são correlacionados inversamente em vivo (EKLOF et al., 2000) e o tratamento com a auxina pode rapidamente inibir a biossíntese de citocininas (NORDSTROM et al., 2004).

As giberelinas são hormônios produzidos principalmente nas raízes e nos brotos foliares, que atuam no crescimento de caules e folhas, mas seu efeito nas raízes é pequeno. Sua interação com as auxinas proporcionam desenvolvimento dos frutos, já com citocininas atuam na germinação das sementes. Como ocorre com o etileno, a auxina inicia a produção do ácido giberélico (ROSS et al., 2000).

O etileno é o único fitohormônio na forma de gás e é produzido em diversas partes da planta e difundi-se no espaço entre as células. Os frutos em amadurecimento são resultado da ação do etileno. Juntamente com a auxina o etileno participa na abscisão das folhas enfraquecendo suas células a tal ponto que o seu peso é suficiente para provocar o rompimento com o caule. A auxina e o etileno gasoso estão ligados de tal maneira que a exposição exógena da auxina estimula a produção de etileno (MORGAN, 1962) por meio da indução de um gene

que codifica a enzima para biossíntese do etileno (ABEL et al., 1994). De maneira inversa, o etileno inibe o transporte da auxina (BURG; BURG, 1966).

O AIA (ácido indol acético) é a principal auxina encontrada nas plantas e produzida principalmente no meristema apical (gema) do caule, sendo transportada através das células do parênquima até as raízes. O transporte de AIA pela planta é unidirecional, dependendo de energia para que esta ação ocorra.

O principal efeito da auxina é promover o crescimento de raízes e caules, por meio do alongamento das células recém formadas nos meristemas. Porém, esse efeito depende da concentração do hormônio, onde em alguns tecidos as auxinas controlam a divisão celular. Tal importância é clara no estudo de cultura de tecidos vegetais, onde sem a auxina esta técnica não seria possível. Em concentrações muito altas a auxina inibe a prolongamento celular e conseqüentemente, o crescimento do órgão. A resposta da auxina nas células varia de planta para planta, sendo que na raiz seus efeitos são mais sensíveis do que no caule.

Existem dados suficientes para demonstrar que o AIA é sintetizado a partir do triptofano. Esta transformação pode ser realizada por microrganismos que produzem uma conversão oxidativa quando o triptofano se encontra em presença de peroxidases e de radicais livres.

No Brasil, estudos têm sido realizados com linhagens de *Azospirillum lipoferum*, *A. brasiliense* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* capazes de produzir AIA e compostos relacionados. Estas bactérias também são capazes de fixar N₂ aumentando o seu potencial para a promoção de crescimento. Quatro isolados de *G. diazotrophicus* dos tecidos da raiz de cenoura, rabanete, beterraba e café, produziram AIA na presença do triptofano (MADHAIYAN, SARAVANAN et al., 2004).

Considerando a falta de informações sobre a microbiota encontrada em manguezais e todo o potencial que pode ser explorado deste ecossistema principalmente das bactérias endofíticas, fica claro a necessidade de estudos neste ambiente com características tão peculiares. A avaliação da microbiota é de grande importância ao ponto de vista biotecnológico para a sua potencial utilização em indústrias e na agricultura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais de coletas

Para a realização do presente trabalho, foram coletados ramos de diferentes espécies de mangue presentes em Bertioga e Cananéia, SP (Tabela 1). As coletas nestes dois locais foram realizadas no verão e inverno, sendo que as coletas no manguezal de Bertioga foram realizadas em local impactado, o qual sofreu derramamento de petróleo na década de 1980 (Local A) (Figura 1), e em local não impactado por derramamento de petróleo (Local B). Em Cananéia (Local C) foram coletadas amostras vegetais das mesmas espécies no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), local considerado ainda preservado. Em cada local e época foram coletados ramos de cinco plantas de cada espécie: *Rhizophora mangle* (mangue vermelho)– espécie 1, *Laguncularia racemosa* (mangue Siriba)– espécie 2 e *Avicenia nitida* (mangue branco) – espécie 3. Entretanto, a espécie *L. racemosa* não foi encontrada na coleta realizada no inverno no local B (Bertioga não impactado), não sendo possível realizar o isolamento dessa espécie vegetal para esse período.

Tabela 1 - Pontos de coletas das espécies vegetais nos manguezais

Local	Localização geográfica
A - Bertioga impactado	S 23 ⁰ 53' 46.0"/WO 96 ⁰ 12' 49.7"
B - Bertioga não impactado	S 23 ⁰ 54' 01.1"/WO 46 ⁰ 15' 01.3"
C – Cananéia	S 25 ⁰ 05' 87"/WO 47 ⁰ 57' 70"



Figura 1 - Coleta de material vegetal em manguezal de Bertioga, SP, local considerado impactado pelo derramamento de óleo

3.2. Isolamento bacteriano

3.2.1. Isolamento e estocagem das bactérias endofíticas de *R. mangle*, *L. racemosa* e *A. nitida*

Após a desinfecção superficial (ARAÚJO et al., 2001), os ramos foram cortados em fragmentos de aproximadamente 1 cm e foram então homogeneizados na presença de 1 mL de tampão PBS (140mM de NaCl, 3mM de KCl, 10mM de Na_2HPO_4 e 2mM de KH_2PO_4 , pH 7,4). Para a verificação da eficiência do processo de desinfecção superficial, alíquotas de água destilada (0,1mL) utilizada na última lavagem dos tecidos vegetais foram semeadas em meio de TSA 5% e incubadas a 28°C por até 10 dias.

O extrato vegetal foi transferido para um tubos de 15 mL sendo agitado por 1 hora á 180 rpm. Após esse período, foram feitas diluições em tampão PBS, e alíquotas de 100 μL foram semeadas sobre meio TSB 5% (tripto caseína de soja), (Merck) suplementado com Benomyl, ($50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), para inibição do crescimento fúngico. Em seguida as placas foram incubadas a 28°C por até 15 dias. Das colônias

bacterianas obtidas a partir do isolamento, foram selecionadas ao acaso e purificadas aproximadamente 1000 colônias para serem estocadas. As colônias purificadas foram então crescidas em meio TSB líquido e em seguida transferido para microplacas de 96 cavidades sendo então adicionado glicerol (15% - concentração final) e os isolados foram estocados a temperatura de -80°C .

3.3. Produção enzimática

Os 1000 isolados bacterianos estocados dos manguezais de Bertioga e Cananéia foram avaliados qualitativamente quanto à capacidade de produção das seguintes enzimas: celulase (endoglicanase), amilase, protease, lipase, fosfatase e esterase. Devido o alto número de isolados obtidos e estocados não foi possível avaliar cada um separadamente, sendo necessário a realização de uma triagem (a fim de reduzir o número de isolados) e só após foi possível dar seqüência aos experimentos seguintes. Para tanto, foi realizado ensaios com repicador de 96 pontos, o que tornou possível a realização de um teste amplo abrangendo os 1000 isolados estocados. Com o resultado desta triagem obtiveram-se isolados que apresentaram atividades para uma única enzima assim como para duas, três ou todas as enzimas avaliadas. Desta maneira, foi inviável trabalhar com número tão alto de isolados sendo necessário uma segunda triagem. O critério utilizado foi selecionar os isolados que apresentaram resultado positivo para três ou mais atividades enzimáticas. Com isso chegamos ao número de 274 isolados para dar continuidade aos testes seguintes. Assim, foi possível uma investigação mais minuciosa do potencial enzimático de cada isolado com avaliação semi-quantitativa, em placas individuais. O índice enzimático de cada isolado foi expresso pela relação entre a média do diâmetro do halo pela média do diâmetro da colônia.

3.3.1 Produção de celulase (endoglicanase)

As bactérias foram crescidas em meio M9 (Sigma) contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% de Carboximetilcelulose (CMC) (v/v) e 18 g/L de ágar pH 7,0. Após o crescimento bacteriano, foram adicionados 10 mL do corante vermelho congo (1%) e posteriormente lavou-se com NaCl (5M). A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a produção de endoglicanase (TEATHER; WOOD, 1982).

3.3.2. Produção de amilase

As bactérias foram crescidas em meio M9 (Sigma) contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% de amido solúvel (v/v) e 18 g/L de ágar pH 7,0 a 28°C por até 72 horas. Após o crescimento bacteriano, foram adicionados 5 mL de solução de iodo (1%). A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a produção de amilase (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

3.3.3 Produção de protease

Para avaliação da atividade proteolítica foi preparado o meio contendo: 5 g/L de triptona; 2,5 g/L de extrato de levedura; 1 g/L de glicose, 2,5 g/L de NaCl e 18 g/L de ágar 18 g/L, pH 7,0. Após a esterilização do meio foi adicionado 100 mL de leite desnatado. A formação de halo ao redor da colônia indicou atividade proteolítica (QUECINE, 2010).

3.3.4 Produção de lípase

O meio usado para detecção de lípase continha: 10 g/L de peptona, 5 g/L de NaCl, 0,1 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 18 g/L de ágar sendo o pH ajustado para 7,4. Após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (v/v) de Tween 20 previamente esterilizado. A presença de halos formados por cristais indicou a secreção de lípase pelas linhagens inoculadas (SIERRA, 1957).

3.3.5 Produção de esterase

A metodologia utilizada para observação da produção de esterase foi a mesma utilizada para lipase, sendo substituído o Tween 20 pelo Tween 80. A produção de esterase foi indicada pela presença de halos claros ao redor da colônia bacteriana (SIERRA, 1957).

3.3.6. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico

Foram selecionadas 274 bactérias endofíticas isoladas de ramo de plantas de mangue localizadas em Cananéia e Bertioga (locais com e sem impacto pelo derramamento de óleo) para os testes a seguir. Esta seleção foi feita partindo da escolha de isolados que apresentaram atividades para 3 ou mais enzimas testadas.

Para a seleção das bactérias solubilizadoras de fosfato, foi utilizada a metodologia de Verma et al. (2001). As bactérias foram inoculadas em meio de cultura sólido contendo fosfato de cálcio insolúvel. As placas foram incubadas a 28°C por 5 dias e em seguida foi verificada a presença de um halo claro em volta da colônia indicando a solubilização do fosfato.

3.4 Seleção de bactérias com capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN)

Após o teste de solubilização de fosfato, os isolados que apresentaram resultado positivo foram testados quanto à fixação de nitrogênio e a produção de AIA. O resultado positivo para a fixação de nitrogênio foi comprovado por uma nuvem, que corresponderia ao halo, no meio de cultura. O meio NFb, livre de nitrogênio, foi preparado contendo (em g.L⁻¹): ácido málico, 5; K₂HPO₄, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 0,2; NaCl, 0,1; CaCl₂.2H₂O, 0,02; KOH, 4,5; e em mL: solução de micronutrientes, 2; solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH), 2; solução de FeEDTA (solução 1,64%), 4; e solução vitaminas, 1; pH 6,5 (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Foram utilizados tubos de ensaio de 20x70 mm, contendo 10mL de meio NFb semi-sólido, onde cada amostra dos isolados foi inoculada por meio de alças de platina em triplicata, a partir de culturas já crescidas em meio TSA (Trypcase Soy Agar) 10%, e introduzidas até o meio do tubo. O período de incubação foi de 5 dias a 28°C no escuro. Após esse período foi verificada a formação de um disco de crescimento próximo a superfície dos tubos e realizada nova repicagem das bactérias em NFb semi-sólido. Esse procedimento foi repetido mais 5 vezes.

3.5 Seleção de bactérias produtoras de Ácido Indol Acético (AIA)

A seleção de bactérias produtoras de AIA foi realizada utilizando-se a técnica qualitativa de Bric et. al., (1991). Após o teste de solubilização de fosfato, com os 274 isolados, foi realizado o teste de AIA qualitativo. Os isolados que apresentaram resultado positivo para solubilização de fosfato foram submetidos ao teste de AIA, tanto qualitativo quanto quantitativo. No teste qualitativo 115 isolados foram inoculados em placas de Petri contendo meio sólido TSA 10% suplementado com 5 mM de L-triptofano, imediatamente cobertas com membrana de nitrocelulose e incubadas por 24 h a 28°C. Em seguida, a membrana foi removida e tratada com 10 ml do reagente de Salkowski (2% de FeCl_3 0,5 M em 35% de ácido perclórico). A reação foi mantida a temperatura ambiente por 15 min. Os experimentos foram realizados em duplicata e a presença de halo rosa em torno da colônia indicou a produção de AIA.

Para a quantificação da produção de AIA, os mesmos 115 isolados foram crescidos em meio líquido de TSB 10% suplementado com 5mM de L-triptofano. As culturas foram mantidas a 28°C e incubadas no escuro, sob agitação constante de 160 rpm durante 48 horas. Após esse período, 1,5 mL da cultura bacteriana foram centrifugados a 5000 x g durante 10 min. para a obtenção de sobrenadante. Em seguida retirou-se 600 μL da cultura e foram acrescentados 900 μL do reagente de Salkowisk mantendo-se a temperatura ambiente, no escuro, por 30 min. Após retirou-se 1 mL desta mistura e foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm de absorbância. As leituras foram normalizadas por meio de curva padrão com diferentes concentrações de AIA comercial (Figura 15). Como controle positivo foi utilizada a bactéria *E. coli* linhagem DH5- α . (ASSUMPÇÃO et.al., 2009). As amostras foram crescidas em triplicata para cada isolado.

3.6 Identificação dos isolados produtores de enzimas por seqüenciamento do gene 16S rDNA

Devido à grande quantidade de bactérias obtidas e estocadas durante o isolamento, para a identificação dos isolados, foram selecionados aqueles que

apresentaram resultado positivo para atividade enzimática de 3 ou mais enzimas (independente de local, planta ou época) e os isolados que tiveram resultado positivo para solubilização de fosfato. Após esta seleção, foram identificadas 115 bactérias.

A identificação dos isolados bacterianos foi determinada pelo seqüenciamento parcial do gene 16S rDNA. Para a amplificação da região 16S rDNA foram utilizados o iniciador (“*primer*”) R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') e PO27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'). As reações foram realizadas em um volume de 50 µL contendo: 31,8 µL de água deionizada; 5,0 µL de tampão; 7,5 µL de MgCl₂; 4,0 µL dNTP; 0,1 µL de cada “*primer*”; 0,5 U de Taq DNA polimerase e 1 µL de DNA molde. A PCR foi realizada em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 min. a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 seg. a 94°C; 1 min. a 62,5°C; 1min. a 72°C, e uma extensão final de 7min. a 72°C. A confirmação da amplificação do DNA foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2% juntamente com um marcador de peso molecular DNA *Ladder* pela observação de fragmentos com aproximadamente 1400 pares de bases (pb). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio e fotodocumentado.

A purificação dos produtos de PCR amplificados foi feita com polietileno glicol (PEG 8000), Foram adicionados no microtubo de PCR 50 µL de PEG e homogeneizado e em seguida incubado por 15 min. a 37°C. Após, o microtubo foi centrifugado a 13.000g por 15 min. e retirado todo sobrenadante. Em seguida foram adicionados 125µL de etanol 80% gelado e incubou-se por 1 min. a temperatura ambiente. Retirou-se o sobrenadante e foi repetido todo processo a partir da inclusão do etanol. Após a remoção do sobrenadante o microtubo foi colocado para a secagem a 37°C por 15 a 20 min. e em seguida adicionados 20 µL de água milliq e mantidos armazenados em refrigerador. Os fragmentos de 1400 pb foram enviados para terceirização do seqüenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano, USP/São Paulo.

Para a avaliação das seqüências, foram realizadas comparações com seqüências já depositadas no *GenBank* por meio de *Blastn* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e consideradas aquelas que apresentaram o maior *score* e valores de similaridade.

3.7 Promoção de crescimento vegetal por bactérias endofíticas isoladas de manguezal

Com os bons resultados obtidos nos testes enzimáticos, solubilização de fosfato, produção de auxina, e fixação de nitrogênio, foi possível a seleção de alguns isolados endofíticos com alto potencial biotecnológico para utilização no ensaio para promoção de crescimento vegetal. A eficácia das espécies selecionadas com promoção de crescimento já são relatadas em algumas plantas. Para os ensaios foram determinadas as avaliações por meio de variáveis como peso seco e fresco das raízes e parte aérea das plantas.

3.7.1 Promoção de crescimento de cana-de-açúcar

Os ensaios visando testar a promoção de crescimento em cana-de-açúcar foram realizados em casa de vegetação com temperatura variando entre 25 °C a 35 °C. As plântulas foram gentilmente cedidas pela CanaVialis, uma empresa que trabalha com o desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar visando melhorias no setor sucroalcooleiro. A sede da empresa, onde foram cedidas as mudas, está localizada na Rodovia Anhanguera KM 104 Condomínio Techno Park, Rua James Clerk Maxwell 360 em Campinas – SP.

Foram realizados 5 tratamentos com repetição de 30 plântulas para cada um. Cada tratamento contou com diferentes bactérias endofíticas que foram selecionadas por apresentarem a combinação de produção de AIA, atividade para fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato a fim de identificar qual apresentaria o melhor resultado:

- Controle - meio de cultura sem inoculação bacteriana,
- Tratamento 1: *Curtobacterium flaccumfaciens* (isolado MBR 2.22),
- Tratamento 2: *Pantoea dispersa* (isolado MBIL 2.47),
- Tratamento 3: *Pantoea agglomerans* (isolado MBIL 2.33),
- Tratamento 4: *Bacillus pumilus* (isolado MBA 2.34),
- Tratamento 5: Consórcio – todas as bactérias descritas acima em uma mistura proporcional.

Para a obtenção dos inóculos, as bactérias avaliadas foram crescidas nas mesmas condições: em meio de cultura líquido (TSB) durante 24h e incubadas a 28°C, em agitação constante (120rpm). A inoculação das bactérias foi realizada através de adição da suspensão bacteriana no substrato com as plântulas. Após as inoculações, as plântulas foram mantidas em casa de vegetação por 45 dias, regadas com água sem aditivos, de acordo com a necessidade (dias quentes duas vezes ao dia, dias com temperaturas mais amena 1 vez ao dia).

3.7.2 Promoção de crescimento em planta de monjoleiro

O experimento avaliou a promoção de crescimento de Monjoleiro (*Acacia polyphylla*) – uma planta arbórea muito utilizada para reflorestamento principalmente em área de mata ciliar. As mudas, assim como as instalações para o desenvolvimento do experimento, foram gentilmente cedidas pela Bioflora. A Bioflora é uma empresa de reflorestamento que atua em todos os segmentos envolvendo restauração de florestas nativas. Está localizada na Rodovia Piracicaba – Tupi, no KM 18 Piracicaba – SP. Todas as condições de cultivo foram mantidas de acordo com as normas e técnicas aplicadas pela empresa.

Para a realização deste ensaio foi utilizado o mesmo método de obtenção e inoculação das bactérias empregado no ensaio com cana-de açúcar.

Foram realizados 7 tratamentos com 25 plantas em cada um, com diferentes isolados bacterianos a fim de identificar qual apresentaria o melhor resultado.

- Controle A: meio de cultura sem adição de bactéria.
- Controle B: meio de cultura sem bactéria com adição da adubação normal da empresa
- Inóculo 1: *Pseudomonas fluorescens* (isolado MCR 1.10)
- Inóculo 2: *Enterobacter* sp. (isolado MCR 1.48)
- Inóculo 1 + adubação da empresa
- Inóculo 2 + adubação da empresa
- Consórcio: Inóculo 1 + Inóculo 2

Após as inoculações, as mudas foram mantidas em viveiro por 60 dias seguindo as normas e rotina da empresa. Após este período as plantas foram

coletadas para a realização da avaliação do experimento tendo como base a biomassa seca e fresca.

Em ambos os experimentos, as plantas após serem coletadas foram lavadas em água corrente para remoção do substrato aderido a raiz e posteriormente separado o sistema radicular de parte aérea. A avaliação da promoção de crescimento foi realizada através da comparação do peso seco e fresco das raízes e parte aérea das plantas tratadas com o controle.

3.8. Análise estatística

A análise estatística de todos os dados obtidos foi realizada com o auxílio do programa SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Para a análise dos dados do isolamento, o número de colônias encontradas por espécie e nos dois tempos avaliados foi convertido a $\log_{10} (\text{UFC} + 1)$ /grama de tecido considerando o delineamento experimental como sub-fatorial, amostras retiradas ao longo do tempo, com cinco repetições cada. Os ensaios de promoção de crescimento vegetal foram considerados o delineamento experimental como inteiramente casualizado.

4 RESULTADOS

4.1. Isolamento bacteriano

Por meio do isolamento de bactérias endofíticas de ramos das três principais espécies vegetais, *R. mangle*, *A. nítida* e *L. racemosa* de manguezais que ocorrem na costa do litoral Paulista, foi possível verificar a existência de um grande número de bactérias cultiváveis, co-habitando essas espécies vegetais como endófitos. O número total de bactérias desta comunidade variou entre 10^4 a 10^6 UFC/g de tecido (Figura 2). Pela análise estatística, no local A (Bertioga impactado), única diferença significativa ocorreu em *L. racemosa* na qual o número de bactérias foi menor no verão em relação ao inverno.

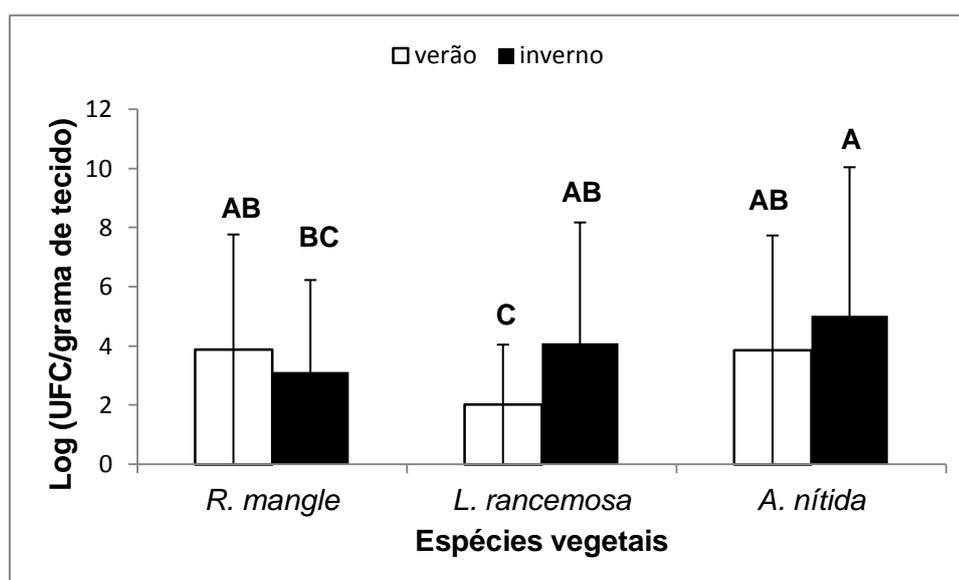


Figura 2 - Número de bactérias endofíticas presentes nos ramos de *R. mangle*, *L. racemosa* e *A. nitida* em isolamento realizado durante o período de verão e inverno em Bertioga impactado. Os dados apresentados são a média de cinco repetições. Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

No local B (Bertioga sem impacto) a quantidade de bactérias não pode ser avaliada na espécie *L. racemosa* devido a um problema na coleta no período do inverno. Analisando os resultados dos períodos em que foram realizadas as coletas entre as três espécies vegetais no local B, foi observado que não houve diferença significativa apenas entre o número de bactérias em *A. nitida* em relação ao verão (Figura 3).

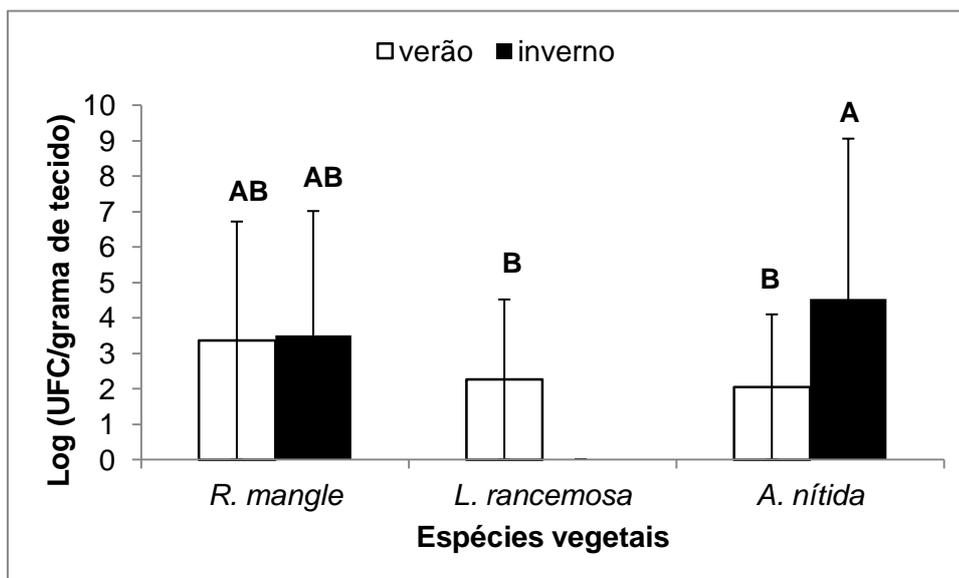


Figura 3 - Número de bactérias endofíticas presentes nos ramos de *R. mangle*, *L. racemosa* e *A. nitida* em isolamento realizado durante o período de verão e inverno em Bertioga não impactado. Os dados apresentados são a média de cinco repetições, tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

No isolamento das bactérias endofíticas provenientes do material vegetal coletado na Ilha do Cardoso (Cananéia, SP) local C, a análise estatística indicou diferença significativa entre *A. nitida* tanto no inverno como no verão em relação a *L. racemosa* (inverno e verão) e *R. mangle* (inverno) na variável época em relação as outras plantas (Figura 4).

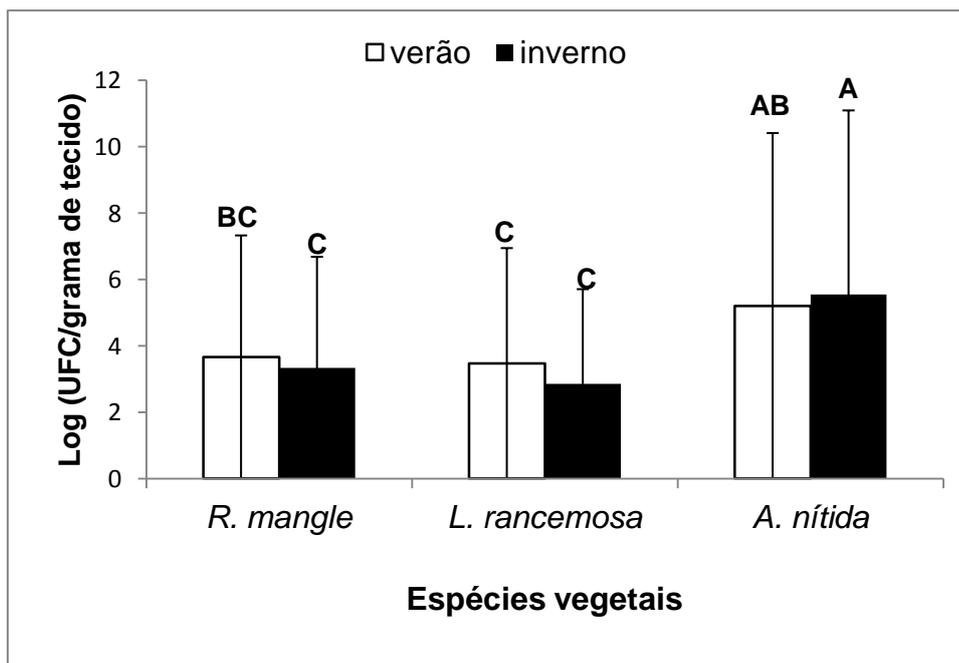


Figura 4 - Número de bactérias endofíticas presentes nos ramos de *R. mangle*, *L. rancemosa* e *A. nítida* no isolamento realizado durante o período de verão e inverno em Cananéia. Os dados apresentados são a média de cinco repetições tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

4.2. Produção enzimática

4.2.1 Bactérias utilizadas para verificação de sua produção enzimática.

Do total de bactérias isoladas (item 3.2.1) foram selecionadas e estocadas 1000 de maneira aleatória como mostra a Tabela 2.

4.2.2 Avaliação qualitativa de atividades enzimáticas produzidos por isolados bacterianos

Foi realizada uma seleção inicial para avaliação qualitativa das atividades enzimáticas (amilase, esterase, lipase, protease, endoglicanase, e solubilização de fosfato) das 1000 bactérias endofíticas estocadas. Verificou-se que cerca de 75% dos isolados apresentaram atividade para pelo menos uma das enzimas avaliadas. A avaliação preliminar da atividade enzimática *in vitro* está mostrado na figura 5.

Tabela 2 - Números de isolados bacterianos endófitos selecionados para os testes enzimáticos em relação às variáveis planta, local e época

PLANTA	LOCAL				ÉPOCA	
	BI	C	B	Total	Verão	Inverno
<i>Rhizophora mangle</i>	72	141	135	348	213	135
<i>Laguncularia racemosa</i>	138	103	42	283	138	145
<i>Avicenia schaueriana</i>	111	143	115	369	200	169
TOTAL*	321	387	292	1000	551	449

*Total de isolados selecionados - BI: Bertioga Impactado; C: Cananéia; B: Bertioga sem impacto

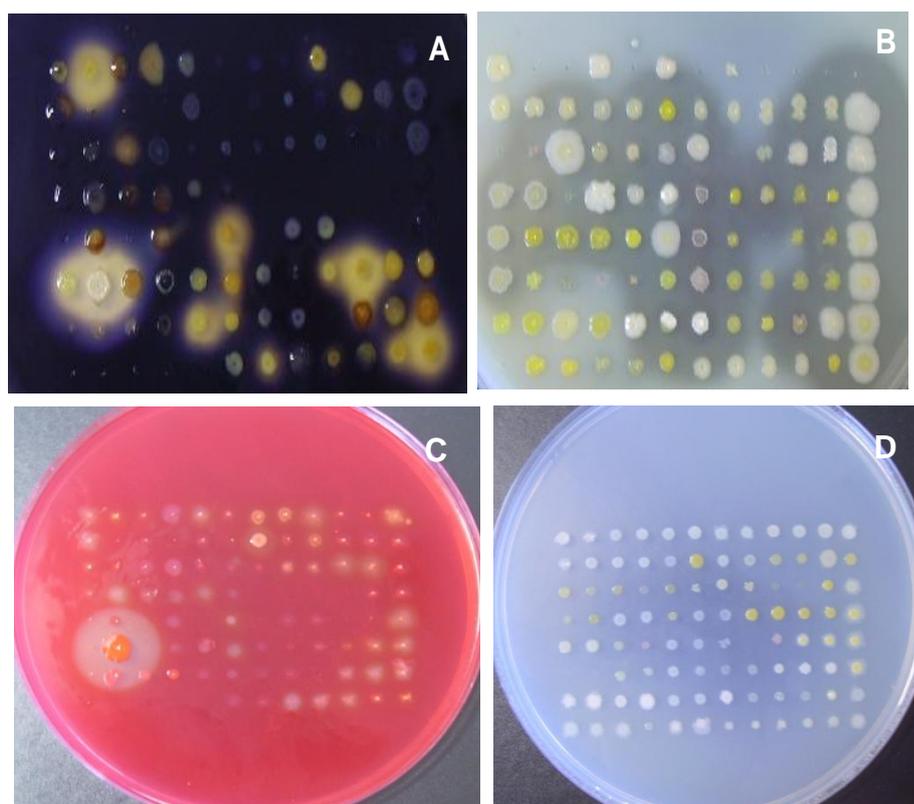


Figura 5 - Seleção *in vitro* bactérias endófitas isoladas dos manguezais em placas de 96 poços, para produção enzimática: (A) amilase, (B) protease, (C) endoglicanase e (D) TSB 5%.

4.2.2.1. Atividade enzimática na localidade de Bertioga

Neste local foram avaliados 321 isolados quanto à produção enzimática, havendo variações nas freqüências dos isolados, não sendo possível co-relacionar local, planta e época (Figura 6) (Tabela 3).

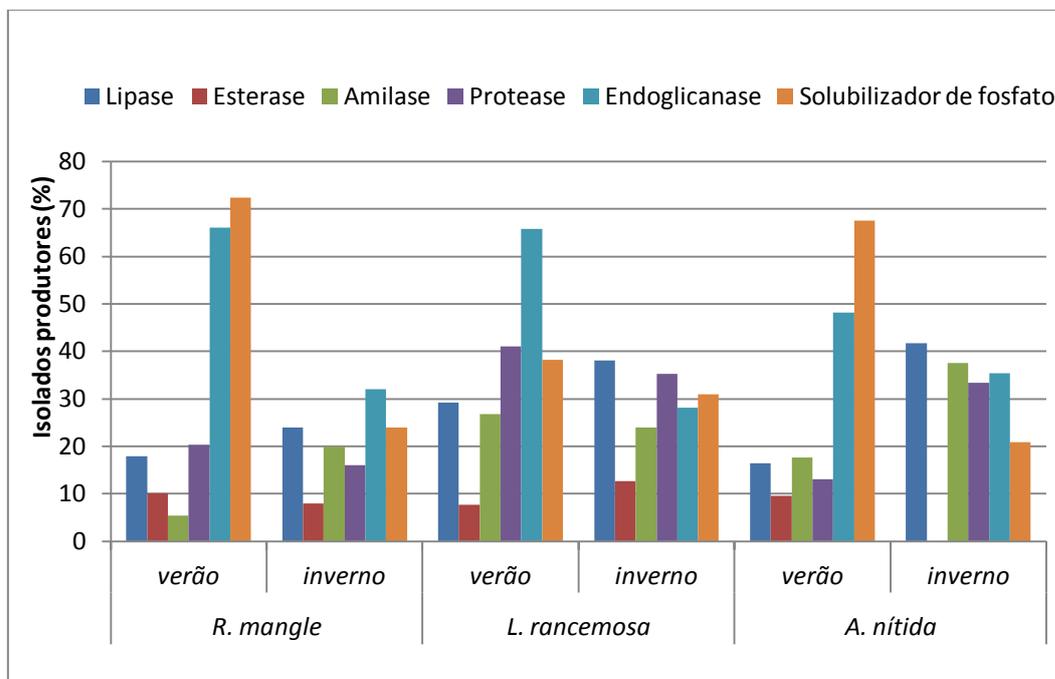


Figura 6 - Percentual de produção enzimática das bactérias endofíticas isoladas do manguezal impactado por derramamento de óleo em Bertioga obtidas de três plantas *R. mangle*, *L. rancemosa*, *A. nitida* e em duas épocas: verão e inverno.

Tabela 3 - Percentual enzimático dos isolados obtidos em Bertioga impactado

ENZIMA	ESPÉCIES VEGETAIS					
	<i>R. mangle</i>		<i>A. nitida</i>		<i>L. rancemosa</i>	
	Inverno %	Verão %	Inverno %	Verão %	Inverno %	Verão %
Protease	16,3	20,3	33,3	13,0	35,2	41,0
Lípase	24,4	17,8	41,6	16,4	38,0	29,2
Esterase	8,6	10,1	0,0	9,5	12,6	7,7
Endoglicanase	32,4	5,3	35,4	48,2	28,1	65,8
Fosfatase	24,2	72,4	20,8	67,5	31,4	38,2
Amilase	20,6	5,3	37,5	17,6	24,3	26,8

4.2.2.2 Avaliação enzimática em Bertioga não Impactado

Para este local avaliou-se 292 isolados, dos quais apresentaram variações na frequência entre as atividades enzimáticas para plantas e épocas (Figura 7 e Tabela 4). Não foi possível destacar e co-relacionar uma espécie vegetal com uma enzima ou época.

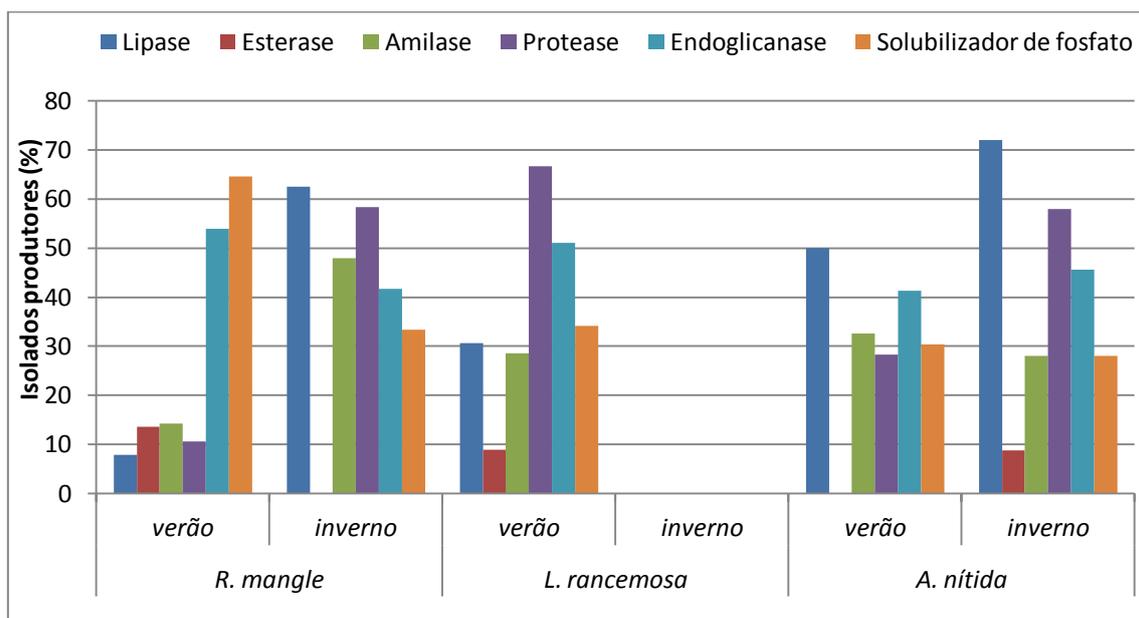


Figura 7 - Percentual de produção enzimática das bactérias endofíticas isoladas do manguezal não impactado em Bertioga obtidas de três plantas *R. mangle*, *L. rancemosa*, *A. nitida* e em duas épocas: verão e inverno.

Tabela 4 - Percentual enzimático dos isolados obtidos em Bertioga não impactado

ENZIMA	ESPÉCIES VEGETAIS					
	<i>R. mangle</i>		<i>A. nitida</i>		<i>L. rancemosa</i>	
	Inverno %	Verão %	Inverno %	Verão %	Inverno % *	Verão %
Protease	58,3	10,6	57,9	28,2	-	66,7
Lípase	62,5	7,9	71,9	50,0	-	30,6
Esterase	0,0	13,6	8,7	0,0	-	8,9
Endoglicanase	41,6	53,9	45,6	41,3	-	51,0
Fostatase	33,3	64,6	32,2	30,4	-	34,2
Amilase	47,9	14,3	28,0	32,6	-	28,6

* Por problemas de coleta não foi possível amostragem da mesma.

Levando em consideração que a área avaliada em Bertioga apresenta locais com e sem impacto foi observado que no local sem impacto houve maior frequência de isolados para as atividades enzimáticas de maneira geral. Logo se pode inferir que a preservação do local (Bertioga não impactado) proporcionou maior frequência de isolados com atividade de isolados com atividade enzimática em relação ao local impactado.

4.2.2.3. Avaliação enzimática em Cananéia

Em Cananéia avaliou-se 387 isolados quanto a produção enzimática. Houve, também, variações nas frequências quanto a sua atividade enzimática. Foi observado que no período do verão o percentual de isolados com potencial enzimático foi superior em relação ao inverno para todas as espécies vegetais (Figura 8 e Tabela 5).

Tabela 5 - Percentual enzimático dos isolados obtidos em Cananéia

ENZIMA	ESPÉCIES VEGETAIS					
	<i>R. mangle</i>		<i>A. nitida</i>		<i>L. rancemosa</i>	
	Inverno %	Verão %	Inverno %	Verão %	Inverno %	Verão %
Protease	21,9	20,9	12,0	49,1	22,7	36,9
Lípase	31,1	3,8	13,3	18,9	4,5	22,6
Esterase	2,7	30,2	0,0	1,0	2,3	4,8
Endoglicanase	11,0	4,6	8,0	43,0	11,4	17,8
Fostatase	38,6	44,2	2,7	40,6	12,2	36,9
Amilase	16,4	34,9	22,7	49,1	13,6	38,1

Neste local, a frequência obtida pelas atividades de solubilização de fosfato e endoglicanase variou entre as épocas apresentando frequências menores quando comparadas com a de outros locais avaliados. Entretanto, Cananéia, foi o local que apresentou as maiores frequências de isolados para produção de amilase e esterase. (Figura 8).

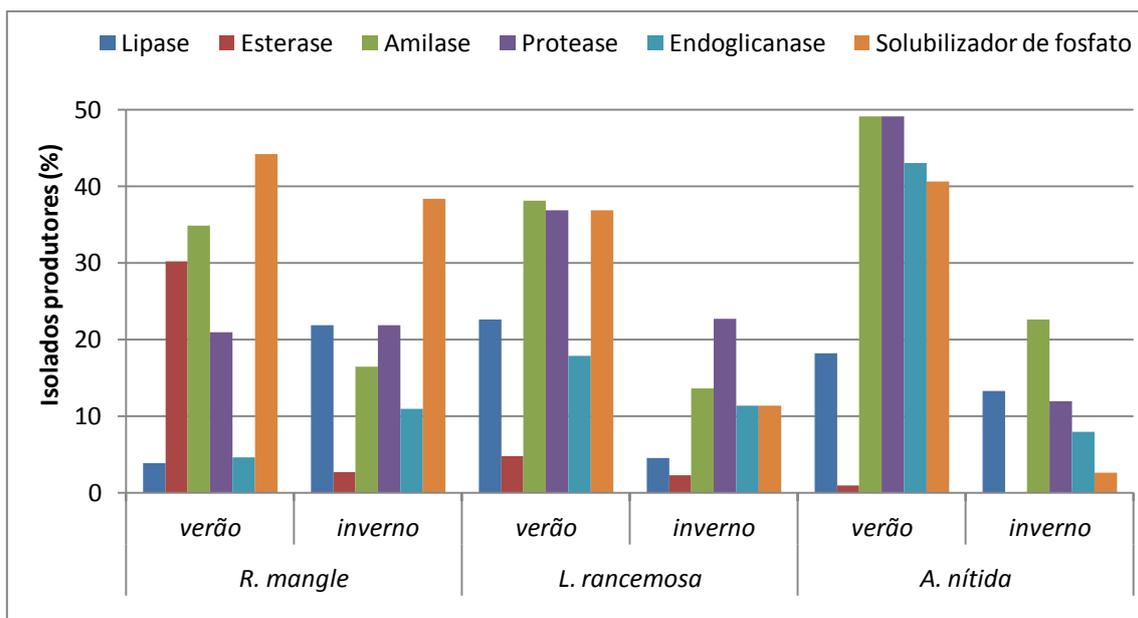


Figura 8 - Percentual de produção enzimática das bactérias endofíticas isoladas do manguezal de Cananéia obtidas de três plantas *R. mangle*, *L. rancecosa*, *A. nitida* e em duas épocas: verão e inverno.

De maneira geral observou-se que os isolados obtidos nos três locais avaliados apresentaram baixa produção de esterases para todas as variáveis avaliadas.

4.2.2.4 Análise da produção de enzimas mediante aos resultados de índices enzimáticos

Após ensaios preliminares qualitativos observou-se que os isolados dos manguezais de Bertioga (impactado e não impactado) e de Cananéia foram capazes de produzir as enzimas: lipase, endoglicanase, amilase, fosfatase, protease e poucos isolados para esterases como pode ser observado nas figuras e tabelas apresentadas acima. A partir deste ensaio foram selecionadas bactérias capazes de produzir três ou mais enzimas dentre as seis testadas. Após essa seleção, foi refeito o experimento com cada isolado separadamente, a fim de obter o índice enzimático, demonstrando assim o potencial biotecnológico dessa comunidade oriunda de plantas do manguezal. Os índices obtidos pelos isolados ficaram entre os intervalos a seguir: amilase 1,47 – 3,25; protease 1,25 – 4,79; endoglicanase 1,51 – 3,53; lipase 1,45 – 4,35; fosfatase 1,35 – 13,75; esterases 1,3 – 2,7.

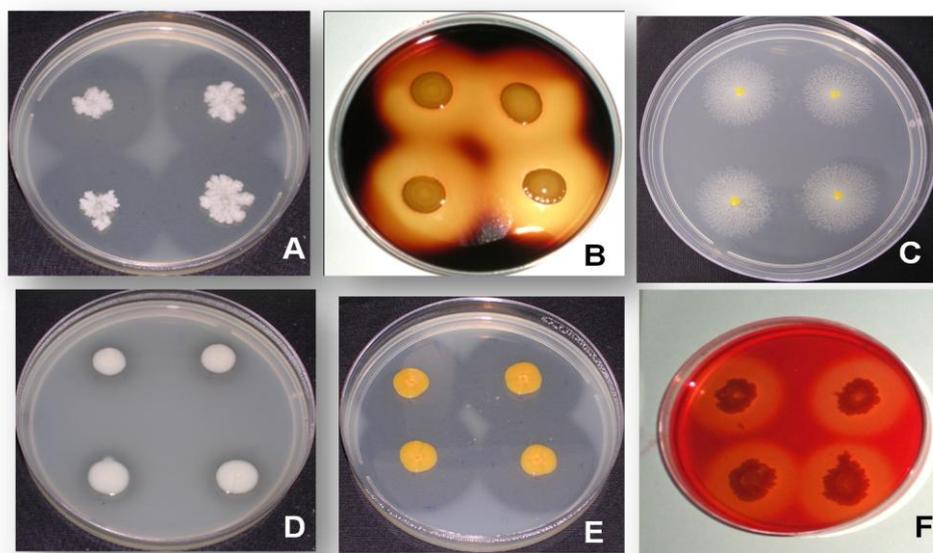


Figura 9 - Produção enzimática por bactérias endofíticas isoladas de espécies vegetais do manguezal. A formação de halo indica a produção enzimática *in vitro*. A: protease; B: amilase, C: esterase; D: lipase; E: fosfatase; F: endoglicanase.

4.2.2.5 Seleção de bactérias com capacidade de fixação de nitrogênio por meio de seu crescimento em meio de cultura livre de nitrogênio

Os 115 isolados que apresentaram capacidade de solubilizar fosfato foram testados para avaliar quanto à fixação nitrogênio. Destes 51 apresentaram as características que comprovaram o crescimento em meio de cultura livre de nitrogênio, o que correspondeu a um percentual 47%.

Em Bertioga não impactado foi observada a maior porcentagem de isolados com capacidade de crescer em meio de cultura livre de oxigênio (Figura 10). Em Bertioga não impactado e impactado, o gênero *Bacillus* apresentou o maior número de isolados, totalizando 22, com capacidade de crescimento em meio NFb.. Em Cananéia, o gênero *Pantoea* apresentou o maior número de isolados fixadores de nitrogênio com um total de 6 neste local.

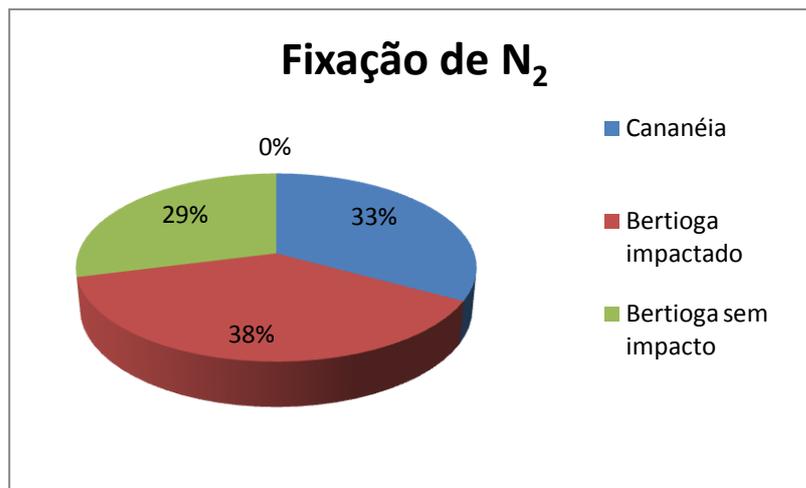


Figura 10 - Percentual de isolados endofíticos de plantas de manguezal com capacidade de fixar nitrogênio.

O gênero *Bacillus* apresentou resultados variados em relação à capacidade de fixar nitrogênio em meio semi-sólido. A espécie *Bacillus pumilus*, independente de localidade, apresentou esta capacidade, demonstrando assim sua importância na fixação de N_2 . A presença de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de manguezal ainda não havia sido relatada, sendo esta a primeira observação neste sentido.

Alguns trabalhos relatam que a modificação da cor no meio de cultura (NFb), está relacionado com o resultado positivo para a fixação de nitrogênio. Porém, este fato está relacionado com a modificação do pH, de básico para ácido (Figura 11). O resultado positivo é obtido por um halo ou “nuvem” como é denominado esta característica (Figura 12 e 13). Portanto, esta é a característica necessária para que a bactéria seja considerada fixadora de N_2 : a presença do halo.

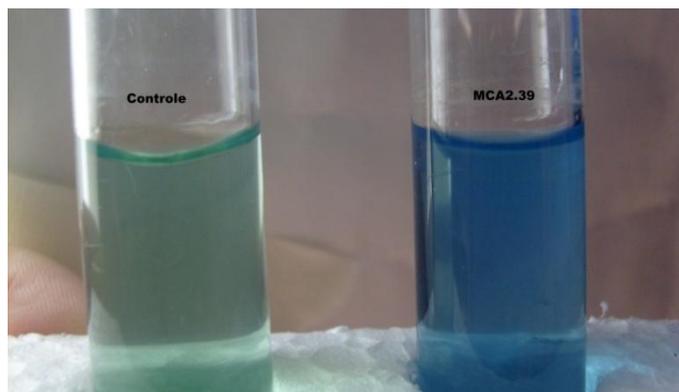


Figura 11 - Modificação do meio de cultura NFb semi-sólido do pH básico (controle) para pH ácido mostrado pelo isolado MCA 2.39 (Tabela 8).

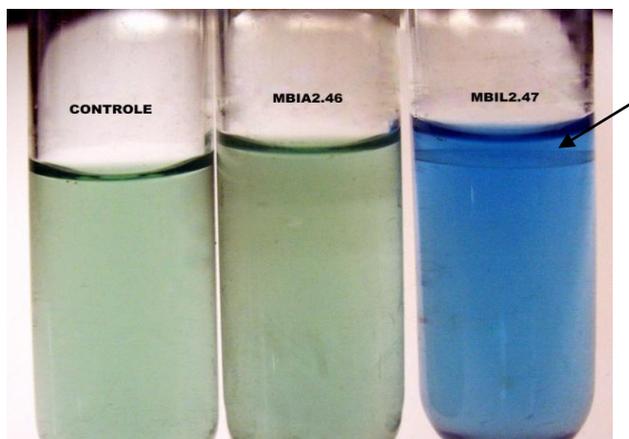


Figura 12 Fixação de nitrogênio, *in vitro*, por bactérias endofíticas do mangue. Formação de halo e mudança de cor no meio de cultura NFb semi-sólido.



Figura 13 - Fixação de nitrogênio, *in vitro*, por bactérias endofíticas de manguezal. Formação de halo no meio de cultura NFb semi-sólido sem alteração do pH.

4.2.2.6 Seleção de bactérias produtoras de Ácido Indol Acético (AIA).

Devido a facilidade, custo e sensibilidade, o reagente de Salkowisk tem sido largamente utilizado na detecção de AIA produzido por bactérias diazotróficas (HALDA-ALIJA, 2003; PEDRAZA et al., 2004). O método colorimétrico baseia-se na oxidação de compostos indólicos por sais férricos. A reação de uma solução de AIA com o reagente de Salkowisk resulta coloração rosa chegando a roxo quando o teste for positivo. Quanto maior a oxidação mais rosa fica a solução.

Os 115 isolados endofíticos foram analisados, de forma qualitativa, quanto a capacidade de produzir ácido indol acético (AIA – auxina) *in vitro*. A metodologia utilizada para a seleção qualitativa foi eficiente mostrando que, dentre os 115 isolados 41 apresentaram a capacidade de produzir este hormônio, resultando em 35,6% dos isolados avaliados. A porcentagem de isolados com capacidade de produzir auxina foi maior em Cananéia com 48% seguido por Bertioga impactado 33% e Bertioga sem impacto 19% (Figura 14). Em relação as plantas, o número de isolados obtidos por cada uma foi praticamente igual, sendo *R. mangle* com 14 isolados, *A. nitida* com 13 e *L.rançemosa* com 14. Do total de isolados positivos para auxina, o maior número foi encontrado no gênero *Pantoea* que, inclusive, foi utilizado como controle positivo no trabalho realizado por Kuklinsky-Sobral et al. 2004.

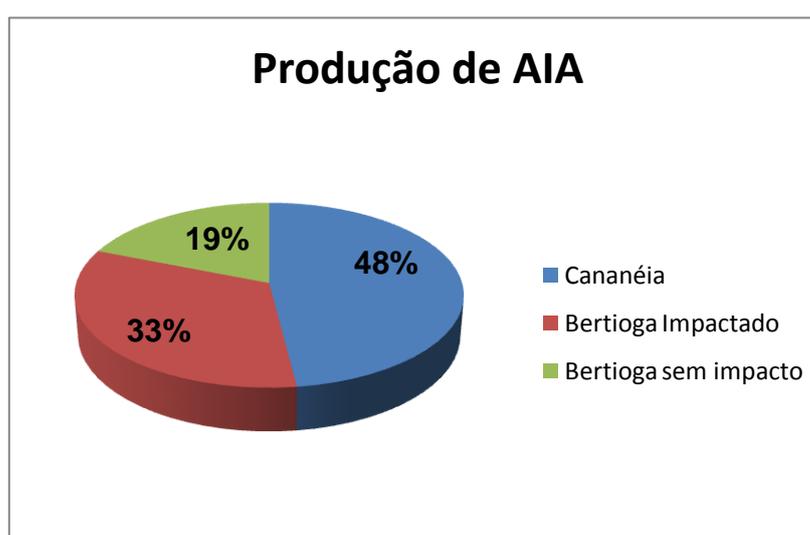


Figura 14 - Porcentagem de isolados endofíticos de plantas de manguezal com capacidade de produzir AIA

Para o teste quantitativo, foram usados os 41 isolados positivos para o teste qualitativo de produção de AIA. Para obtenção dos valores quantitativos foi usada uma curva padrão para avaliar e determinar os valores obtidos pelos isolados (Figura 15).

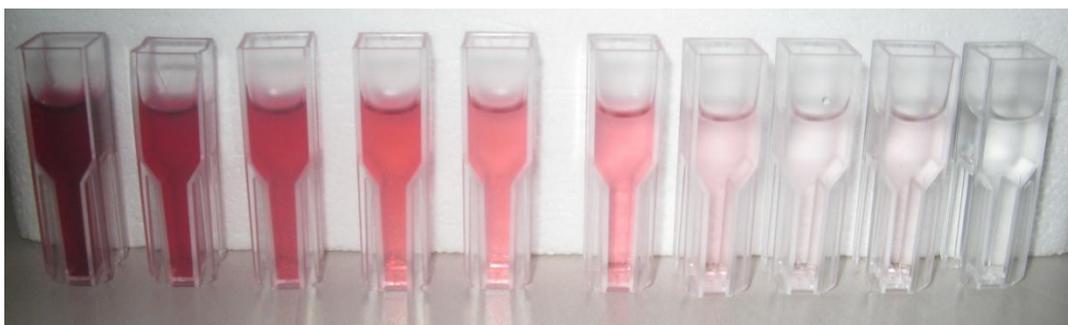


Figura 15 - Curva padrão com diferentes concentrações de AIA comercial

As espécies com alta atividade de AIA neste trabalho podem ser consideradas super produtoras, destacando-se o gênero *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Exiguobacterium*, *Sphingosinicella*, *Erwinia*, *Stenotrophomonas*. A espécie *Exiguobacterium sibiricum* apresentou a maior produção de AIA ($760,7\mu\text{mL}^{-1}$). Este isolado foi obtido no local de Cananéia na planta *R. mangle*, apresentando resultado positivo também para o teste qualitativo. Já o resultado positivo com o valor mais baixo, foi obtido pelo isolado *Curtobacterium flaccumfaciens* localizado em Bertioga não impactado na planta *R. mangle* com uma produção de $16,47\mu\text{mL}^{-1}$.

Diversos trabalhos têm identificado linhagens bacterianas produtoras de AIA (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; TSAVKELOVA et al., 2007). A maioria dos relatos citam valores abaixo dos encontrados neste trabalho. Porém, poucos tem demonstrado a produção de AIA por bactérias endofíticas em geral e principalmente não há relatos de bactérias endofíticas associada a manguezal, produtoras de AIA.

4.3 Identificação dos isolados por seqüenciamento do gene 16S rDNA

Com o alto número de bactérias endofíticas obtidas no isolamento, foi necessária a seleção de isolados, para reduzir o número de bactérias submetidas ao experimento. Um total de 115 isolados foram selecionados e os critérios utilizados foram: o isolado que apresentou produção para mais de 3 enzimas sendo que uma delas deveria ser fosfatase.

Os isolados foram identificados pelo seqüenciamento parcial do gene 16S rDNA (aproximadamente 550pb). Foi utilizando o programa BLASTn para a identificação por similaridade destas seqüências contra a base de dados nt/nr do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). Com a identificação pode-se avaliar quais espécies tiveram atividades para determinadas enzimas, podendo-se co-relacionar com local e espécie (Tabela 6, 7 e 8).

TABELA 6 - Identificação, distribuição dos isolados em relação a produção de enzimas, AIA, fixação de N₂ e IS para fosfatase em *Bertioga* não impactado

ISOLADO	ESPÉCIE VEGETAL	IDENTIFICAÇÃO	SIMILARIDADE (%)	AIA QUALITATIVO	AIA (µg.mL ⁻¹)	ÍNDICE DE SOLUBILIZAÇÃO (IS)*	FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO	ATIVIDADE ENZIMÁTICA
MBA2.45	<i>A. nitida</i>	<i>Novosphingobium sp.</i>	97	-	52,1	1,8	-	A,F,Li
MBA2.34	<i>A. nitida</i>	<i>Novosphingobium sp.</i>	98	-	43,6	1,2	-	P,CMC,Li, F
MBA2.32	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	98	-	35,4	7,0	+	F,A,Li
MBA2.23	<i>A. nitida</i>	<i>Novosphingobium sp.</i>	96	+	28,9	0,5	-	P,A,CMC,F
MBA2.22	<i>A. nitida</i>	<i>Alcaligenes sp</i>	98	+	28,6	3,6	-	P,CMC,F
MBA2.21	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	97	-	31,2	8,0	+	P,F,CMC,Li
MBA2.11	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus sp.</i>	97	-	108,6	6,6	+	P,E,Li,F
MBR2.45	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	97	-	24,4	7,4	+	F,A,CMC,Li
MBR2.42	<i>R. mangle</i>	<i>Bacillus sp.</i>	98	-	88,4	2,1	-	A,L,F
MBR2.40	<i>R. mangle</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	97	-	32,5	7	+	P,A,CMC,Li,F
MBR2.32	<i>R. mangle</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	97	+	274,1	6,5	-	P,A,Li,F
MBR2.30	<i>R. mangle</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	96	+	286,5	9,6	+	P,E,CMC
MBR2.28	<i>R. mangle</i>	<i>Ochrobactrum sp.</i>	98	-	100,3	1,6	+	A,CMC,Li,F

Continua...

Continuação...

ISOLADO	ESPÉCIE VEGETAL	IDENTIFICAÇÃO	SIMILARIDADE (%)	AIA QUALITATIVO	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ÍNDICE DE SOLUBILIZAÇÃO (IS)*	FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO	ATIVIDADE ENZIMÁTICA
MBR2.16	<i>R. mangle</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	98	-	28,3	6,8	+	F,A,CMC,Li
MBR2.7	<i>R. mangle</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	98	+	406,8	8,2	+	P,A,F
MBR2.1	<i>R. mangle</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	97	-	16,5	5,9	+	CMC,Li,F
MBR2.22	<i>R. mangle</i>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	100	-	16,4	8,2	+	P,CMC,E,F
MBIA2.43	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	-	55,6	2,6	+	CMC,Li,F
MBR2.20	<i>R. mangle</i>	<i>Curtobacterium sp</i>	99	-	34,8	1,8	-	P,Li,F
MBR2.33	<i>R. mangle</i>	<i>Ochrobactrum sp</i>	99	+	160,4	2	-	P,CMC,F
MBR2.39	<i>R. mangle</i>	<i>Brucella sp</i>	98	-	22,8	2,6	-	A,CMC,Li
MBR2.41	<i>R. mangle</i>	<i>Bacillus sp</i>	97	-	88,6	4,8	-	P,A,CMC,E
MBR2.4	<i>R. mangle</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	100	-	47,8	3,8	-	A,CMC,F
MBR2.36	<i>R. mangle</i>	<i>Paenibacillus sp</i>	98	-	21,2	2,8	-	P,E,CMC,Li,F
MBR2.21	<i>R. mangle</i>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	99	+	23,4	8,2	-	P,CMC,Li,F
MBR2.29	<i>R. mangle</i>	<i>Stenotrophomonas sp</i>	100	+	443,2	6,5	+	P,A,CMC,Li
MBR2.7	<i>R. mangle</i>	<i>Novosphingobium sp.</i>	96	-	56,8	2,8	-	P,A,Li
MBA2.33	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus sp.</i>	100	-	71,3	6,8	-	P,A,CMC,Li
MBA2.18	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	98	-	27,6	4,2	+	P,CMC,Li,F

Continua...

ISOLADO	ESPÉCIE VEGETAL	IDENTIFICAÇÃO	SIMILARIDADE (%)	AIA QUALITATIVO	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ÍNDICE DE SOLUBILIZAÇÃO (IS)*	FIXAÇÃO DE NITRÓGENIO	Conclusão
								ATIVIDADE ENZIMÁTICA
MBA2.41	<i>A. nitida</i>	<i>Novosphingobium sp.</i>	98	-	34,5	2,1	-	A,CMC,Li
MBA2.16	<i>A. nitida</i>	<i>Alcaligenes sp.</i>	98	+	33,7	3,4	+	P,CMC,Li,F
MBA2.21	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus sp.</i>	98	-	184,3	7,4	-	P,CMC,Li
MBA2.4	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	100	-	34,3	4,8	+	P,CMC,Li
MBA2.44	<i>A. nitida</i>	<i>Sphingosinicella sp.</i>	96	+	87,6	5,4	-	P,Li,F
MBA2.15	<i>A. nitida</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	100	+	32,8	3,5	+	P,Li,F

A: amilase – E: esterase - P: protease - Li: lipase - F: Fosfatase (solubilização de fosfato) - CMC: endoglicanase

TABELA 7 - Identificação, distribuição dos isolados em relação a produção de enzimas, AIA, fixação de N₂ e IS para fosfatase em Bertioiga impactado

ISOLADO	ESPÉCIE VEGETAL	IDENTIFICAÇÃO	SIMILARIDADE (%)	AIA QUALITATIVO	AIA (µg.mL ⁻¹)	ÍNDICE DE SOLUBILIZAÇÃO (IS)*	FIXAÇÃO DE NITRÓGENIO	ATIVIDADE ENZIMÁTICA
MBIA2.35	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	96	-	27,8	8,5	+	P,F,CMC
MBIL2.50	<i>L. racemosa</i>	<i>Sphingomonas</i> sp.	97	+	40,9	2,0	-	P,Li,F
MBIL2.46	<i>L. racemosa</i>	<i>Pantoea</i> sp.	96	+	220,4	9,8	+	P,E,CMC,Li,F
MBIL2.45	<i>L. racemosa</i>	<i>Xanthomonas</i> sp.	97	-	98,6	4,0	-	P,A,Li,F
MBIL2.17	<i>L. racemosa</i>	<i>Brevundimonas</i> sp.	97	+	46,6	3,4	+	P,F,CMC,Li
MBIL2.24	<i>L. racemosa</i>	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	100	-	81,2	1,5	-	P,A,E,Li
MBIL2.38	<i>L. racemosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	100	-	56,8	2,4	+	P,A,Li,F
MBIL2.63	<i>L. racemosa</i>	<i>Bacillus safensis</i>	100	-	386,6	5,6	+	P,CMC,Li
MBIL2.42	<i>L. racemosa</i>	<i>Bacillus</i> sp	99	-	96,2	3,2	-	P,E,CMC,Li,F
MBIR2.4	<i>Rhizophora mangle</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	100	-	33,2	8,5	+	A,CMC,F
MBIR2.24	<i>Rhizophora mangle</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	100	-	27,6	6,2	+	P,E,CMC,Li
MBIL2.47	<i>L. racemosa</i>	<i>Pantoea dispersa</i>	99	+	422,7	11,2	+	CMC,Li,F
MBIL2.16	<i>L. racemosa</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	97	-	33,6	5,6	+	P,A,CMC,Li
MBIL2.39	<i>L. racemosa</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	100	+	256,8	9,6	+	CMC,Li,F
MBIL2.11	<i>L. racemosa</i>	<i>Bacillus</i> sp	98	-	45,6	5,2	-	P,A,CMC,Li
MBIL2.37	<i>L. racemosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	100	-	33,1	7,2	-	P,A,CMC
MBIL2.64	<i>L. racemosa</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	99	+	188,6	8,4	+	P,E,CMC,Li

Continua...

ISOLADO	ESPÉCIE VEGETAL	IDENTIFICAÇÃO	SIMILARIDADE (%)	AIA QUALITATIVO	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ÍNDICE DE SOLUBILIZAÇÃO (IS)*	FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO	Conclusão
								ATIVIDADE ENZIMÁTICA
MBIR2.2	<i>Rhizophora mangle</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	100	-	34,8	3,6	+	A,E,Li
MBIL2.33	<i>L. racemosa</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	100	+	306,8	9,5	+	CMC,Li,F
MBIL2.51	<i>L. racemosa</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	100	-	21,2	6,0	+	P,A,CMC,F
MBIL2.41	<i>L. racemosa</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	100	-	19,6	5,4	+	P,E,CMC,Li
MBIA2.39	<i>A. nitida</i>	<i>Halomonas sp</i>	100	-	18,4	1,8	-	A,CMC,Li
MBIA2.45	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	99	-	52,4	4,3	-	P,A,CMC,Li,F
MBIA2.46	<i>A. nitida</i>	<i>Brevundimonas sp</i>	100	-	48,6	2,4	-	P,E,Li,F
MBIA2.42	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	-	55,4	3,6	+	CMC,Li,F
MBIA2.40	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	-	48,7	3,8	+	E,CMC,Li,F
MBIA2.5	<i>A. nitida</i>	<i>Halomonas sp</i>	99	-	22,3	2,2	-	P,A,CMC,Li,F
MBIA2.48	<i>A. nitida</i>	<i>Halomonas sp</i>	99	-	26,7	3,1	-	P,A,CMC,Li
MBIA2.36	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus sp.</i>	100	-	100,2	1,8	-	P,A,E,Li,F
MBIA2.22	<i>A. nitida</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	-	45,7	7,6	-	P,A,Li,F
MBIA2.34	<i>A. nitida</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	99	+	204,2	10,2	+	P,A,F

A: amilase - P: protease – E: esterase -Li: lipase - F: fosfatase (solubilização de fosfato) - CMC: endoglicanase

TABELA 8 - Identificação, distribuição dos isolados em relação a produção de enzimas, AIA, fixação de N₂ e IS para fosfatase em Cananéia

ISOLADO	ESPÉCIE VEGETAL	IDENTIFICAÇÃO	SIMILARIDADE (%)	AIA QUALITATIVO	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ÍNDICE DE SOLUBILIZAÇÃO (IS)*	FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO	ATIVIDADE ENZIMÁTICA
MCR2.4	<i>R. mangle</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	94	+	403,8	11,3	+	P, CMC, F
MCR1.48	<i>R. mangle</i>	<i>Enterobacter</i> sp.	94	+	540	11,1	+	P,A,F
MCR1.46	<i>R. mangle</i>	<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	97	+	760,7	4,5	+	P,A,F
MCR1.23	<i>R. mangle</i>	<i>Enterobacter</i> sp.	98	+	477,1	9,0	+	P,E,F
MCR1.10	<i>R. mangle</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	96	+	441,8	6,5	+	CMC,Li,F
MCA2.12	<i>A. nitida</i>	<i>Chryseobacterium</i> sp.	94	-	147,8	1,2	-	P,A,F
MCL2.68	<i>A. nitida</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	97	-	443,3	5,4	-	P,CMC,F
MCL2.66	<i>L. racemosa</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	94	+	513,9	13,7	+	P,CMC,F
MCL2.39	<i>L. racemosa</i>	<i>Bacillus</i> sp	97	-	56,6	4,4	-	F,A,E,Li
MCR2.39	<i>R. mangle</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	98	-	32,4	4,4	+	P,CMC,F
MCR2.49	<i>R. mangle</i>	<i>Bacillus</i> sp	100	-	104,3	3,8	-	P,A,E,F
MCR2.29	<i>R. mangle</i>	<i>Erwinia</i> sp	96	+	601,7	8,2	+	P,CMC,F
MCR2.51	<i>R. mangle</i>	<i>Bacillus safensis</i>	99	-	402,5	2,1	+	P,CMC,Li,F
MCR2.33	<i>R. mangle</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	99	+	124,8	6,8	+	P,CMC,F
MCL2.37	<i>L. racemosa</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i>	97	-	605,3	7,8	+	P,Li,F
MCR2.56	<i>R. mangle</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	100	-	50,7	5	-	P,A,CMC,E,F
MCL2.5	<i>L. racemosa</i>	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	100	-	47,8	2,4	-	A,Li,F

Continua...

ISOLADO	ESPÉCIE VEGETAL	IDENTIFICAÇÃO	SIMILARIDADE (%)	AIA QUALITATIVO	AIA (μmL^{-1})	ÍNDICE DE SOLUBILIZAÇÃO (IS)*	FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO	Conclusão
								ATIVIDADE ENZIMÁTICA
MCL2.65	<i>L. racemosa</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i>	100	+	573,9	11,2	+	P,CMC,F
MCA2.54	<i>A. nitida</i>	<i>Microbacterium sp.</i>	97	-	26,8	1,2	-	P,CMC,F,Li
MCA2.21	<i>A. nitida</i>	<i>Chryseobacterium daejeonense</i>	98	+	118,9	1,2	-	P,A,F
MCA2.9	<i>A. nitida</i>	<i>Brevundimonas sp</i>	99	+	47,6	3,2	-	P,A,F
MCL2.68	<i>L. racemosa</i>	<i>Sphingosinicella sp</i>	98	+	75,4	1,2	+	P,CMC,F
MCA2.51	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	100	+	29,7	5,4	-	P,A,E,Li,F
MCA2.42	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus sp.</i>	100	-	38,5	2,6	+	P,F,CMC,Li
MCL2.64	<i>L. racemosa</i>	<i>Pantoea agglome</i>	98	+	304,2	10,8	+	P,CMC,F
MCA2.20	<i>A. nitida</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	100	-	86,1	1,2	+	P,E,F
MCA2.39	<i>A. nitida</i>	<i>Xanthomonas sp</i>	99	-	99,6	2,2	-	P,A,F
MCA2.53	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	99	+	43,2	3,6	-	P,A,CMC,E
MCA2.56	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	97	+	36,9	3,4	-	P,A,CMC,Li
MCA2.27	<i>A. nitida</i>	<i>Chryseobacterium daejeonense</i>	100	+	113,4	2,1	-	P,A,F
MCA2.41	<i>A. nitida</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	95	+	27,4	7,8	-	CMC,Li,F
MCA2.22	<i>A. nitida</i>	<i>Chryseobacterium daejeonense</i>	98	+	156,7	3,4	-	A,F,Li
MCA2.39	<i>A. nitida</i>	<i>Xanthomonas sp.</i>	98	-	75,1	1,2	-	P,A,F
MCA2.33	<i>A. nitida</i>	<i>Cellulosimicrobium sp</i>	99	-	33,2	1,2	-	P,F,Li
MCL2.64	<i>L. racemosa</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	99	+	186,88	8,3	+	P,CMC,F

A: amilase - P: protease – E: esterase - Li: lipase - F: fosfatase (solubilização de fosfato) - CMC: endoglicanase

4.4 Avaliação de promoção de crescimento vegetal por bactérias endofíticas

Foram selecionadas isolados das espécies: *Curtobacterium flaccumfaciens*, *P. dispersa*, *P. agglomerans*, *Bacillus pumilus* para a realização deste teste. A Tabela 9 mostra as características testadas dos isolados selecionados, os resultados obtidos motivou sua utilização nos experimentos de promoção de crescimento.

Tabela 9 - Bactérias endofíticas isoladas de manguezal com potencial biotecnológico selecionadas para o teste de promoção de crescimento

ISOLADO	ESPÉCIE VEGETAL	LOCAL	IDENTIFICAÇÃO	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	Produção de AIA ($\mu\text{g.ML}^{-1}$)	FIXAÇÃO DE N ₂
MBR 2.22	<i>R. mangle</i>	Bertioga não impactado	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	P, CMC, Li, F	151,02	+
MBIL 2.47	<i>L. rancemosa</i>	Bertioga impactado	<i>Pantoea dispersa</i>	CMC, Li, F	263,98	+
MBIL 2.33	<i>L. rancemosa</i>	Bertioga impactado	<i>Pantoea agglomerans</i>	CMC, Li, F	272,04	+
MBA2.34	<i>A. Nítida</i>	Bertioga não impactado	<i>Bacillus pumilus</i>	P, CMC, Li, F	343,15	+
MCR 1.10	<i>R. mangle</i>	Cananeia	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CMC, Li, F	441,8	+
MCR 1.48	<i>R. mangle</i>	Cananeia	<i>Enterobacter sp.</i>	P, A, F	540	+

4.4.1 Avaliação de promoção de crescimento em cana-de-açúcar

Para determinar a atividade das bactérias selecionadas em relação a promoção de crescimento vegetal, foram realizados testes em plântulas de cana-de-açúcar. Os isolados selecionados foram escolhidos mediante os resultados obtidos em testes *in vitro*. As bactérias utilizadas para o teste em cana-de-açúcar foram a *C. flaccumfaciens*, *P. dispersa*, *P. agglomerans* e *B. pumillus*.

A tabela 10 mostra os resultados da avaliação do experimento de casa de vegetação. Comparando os efeitos dos tratamentos utilizados, a análise estatística realizada com os resultados obtidos não revelou efeito significativo positivo nas características avaliadas, entre testemunha e diferentes inoculações (Figura 18).

Tabela 10 - Efeito da inoculação no solo de bactérias endofíticas isoladas de manguezal no desenvolvimento de plântulas de cana de açúcar após 45 dias

Tratamento	Isolado	Massa matéria fresca parte aérea (g)	Massa matéria seca parte aérea (g)	Massa matéria fresca raiz (g)	Massa matéria seca raiz (g)
Testemunha	-	10.94 a	2,18 ab	3,69 a	0,63 a
Inóculo 1	MBR 2.22	9.20 ab	2,01 bc	2,96 b	0,56 a
Inóculo 2	MBIL 2.47	9.36 ab	1,83 bc	2,91 b	0,49 a
Inóculo 3	MBIL 2.33	8.40 b	1,63 c	2,40 bc	0,46 a
Inóculo 4	MBA 2.34	8.62 b	1,65 c	2,22 c	0,52 a
Consórcio	Consórcio	10.01 ab	2,55 a	2,30 c	0,61 a
Média	-	9.42	1,98	2,75	0,55
Desvio Padrão	-	2,82	0,65	0,92	0,23

Valores na mesma coluna seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

As plântulas do experimento de promoção de crescimento apresentaram diferentes respostas em relação aos parâmetros analisados. O experimento apresentou na maioria resultados neutros ou negativos quando comparados com a testemunha. E em relação a outros tratamentos foi visto que em alguns casos um tratamento superou o outro, porém nunca com a testemunha. Podemos citar o valor obtido pelo tratamento descrito como “consorcio”, o qual teve sua média próxima ao da testemunha e superior ao inoculo 3 e 4 (Tabela 11).

Além da maioria dos isolados não promoverem o crescimento, alguns tiveram efeito negativo no desenvolvimento das plantas. As plantulas inoculadas com os isolados MBA 2.34 (*Bacillus pumilus*) e MBIL 2.33 (*Pantoea agglomerans*) apresentaram diminuição da massa da matéria fresca e seca da parte aérea e da matéria fresca da raiz. Em contrapartida o tratamento descrito como consorcio apresentou uma tendência de aumento da massa da matéria fresca e seca na parte aérea, embora não tenha diferido estatisticamente do tratamento Testemunha.

4.4.2 Avaliação de promoção de crescimento em monjoleiro

O experimento de promoção de crescimento de monjoleiro foi realizado usando-se bactérias endofíticas isoladas de manguezal das espécies: *P. fluorescens* e *Enterobacter* sp. O método de inoculação foi o mesmo utilizado no experimento de cana-de-açúcar, os testes foram realizados com plântulas de monjoleiro mantidas no viveiro da empresa Bioflora (Figura 16 e 17). Os isolados inoculados foram selecionados mediante os resultados de testes que proporcionam a promoção de crescimento vegetal.

Os resultados obtidos na avaliação estatística são mostrados na tabela 11. As plântulas testadas apresentaram diferentes resultados conforme a inoculação de cada isolado. As médias de alguns tratamentos foram superiores a testemunha, em alguns casos, com destaque no resultado obtido pelo inoculo 2 na massa matéria fresca e seca parte aérea e também no aumento da matéria fresca na raiz.



Figura 16 - Experimento em viveiro na empresa Bioflora com plântulas de monjoleiro.



Figura 17 - Plântulas de monjoleiro para avaliação da massa fresca e seca.



Figura 18 - Plântulas de cana-de-açúcar para avaliação de massa fresca e seca A: Testemunha e tratamento 1 – B: Testemunha e tratamento 3 – C: Testemunha e consórcio – D: Testemunha e tratamento 4.

Tabela 11 - Efeito da inoculação no solo de bactérias endofíticas isoladas de manguezal no desenvolvimento de plântulas de monjoleiro após 60 dias

Tratamento	Isolado	Massa matéria fresca		Massa matéria seca		Massa matéria fresca raiz (g)		Massa matéria seca raiz (g)	
		parte aérea (g)		parte aérea (g)					
Controle A	-	0,77	b	0,38	b	1,13	bc	0,61	ab
Controle B	-	1,02	ab	0,43	ab	1,25	abc	0,58	b
Inóculo 1	MCR 1.10*	0,72	b	0,32	b	1,02	c	0,49	b
Inóculo 2	MCR 1.48*	1,15	a	0,50	a	1,75	a	0,82	a
Consórcio	Consórcio**	1,01	ab	0,43	ab	1,39	abc	0,65	ab
Inóculo 1 + adubação	MCR 1.10* + adubação	1,02	ab	0,42	ab	1,20	bc	0,51	b
Inóculo 2 + adubação	MCR 1.48* + adubação	0,99	ab	0,39	ab	1,55	ab	0,65	ab
Média	-	0,95		0,41		1,33		0,62	
Desvio Padrão	-	0,35		0,13		0,57		0,25	

*: Identificação tabela 9

** : união do inoculo 1 e 2

As médias dos resultados obtidos nos tratamentos com isolados bacterianos foram semelhante aos resultados apresentados pelos tratamentos que utilizava a adubação da empresa. Pode-se assim inferir que a utilização de inóculos bacterianos proporciona o desenvolvimento nas plântulas de monjoleiro semelhante ao tratamento que utiliza adubação química da empresa, resultando em economia na adubação e favorecimento ao meio ambiente.

5. DISCUSSÃO

5.1 Número e diversidade de bactérias isoladas dos manguezais do estado de São Paulo

No presente trabalho foram avaliados número e diversidade de isolados bacterianos de 3 plantas de manguezal em 2 localidades (Bertioga com e sem impacto pelo derramamento de petróleo) e em Cananéia, local considerado preservado; e em duas épocas: verão e inverno (Figuras 2, 3, 4).

As avaliações de comunidades microbianas de um ecossistema devem considerar a abundância e distribuição de espécies, diversidade funcional presente na comunidade a ser avaliada. Nesta avaliação, é pertinente levar em consideração as mudanças sazonais sofridas pela população em estudo, tecidos vegetais (MOCALI et al., 2003), espécies de plantas, tipo de solo, interação com outros microrganismos benéficos ou não (ARAUJO et al., 2001; ARAUJO et al., 2002). Estas observações podem afetar a estrutura e composição de espécies das comunidades bacterianas endofíticas cultiváveis que colonizam os tecidos das plantas.

Alguns trabalhos relatam à sazonalidade como causa responsável pelas diferenças encontradas na densidade bacteriana, devido à disponibilidade de nutrientes, que é amplamente afetada pelo regime de chuva e o comportamento de correntes marítimas que variam ao longo do ano (SILVA et al., 2006; KRISHNAN et al., 2007; DIAS et al., 2008). Neste estudo vale ressaltar, o impacto com óleo, sendo um possível responsável por modificação na comunidade avaliada.

Entre os fatores avaliados no presente trabalho tais como: variações sazonais, diferentes espécies de plantas de manguezal, impacto por derramamento de óleo, preservação de ambiente, podem ter sido causas responsáveis pela influência sobre a densidade populacional da comunidade bacteriana endofítica. Porém, devido à quantidade e variação de pessoas na manipulação das amostras durante o isolamento e a amplitude dos dados obtidos, não podemos considerar uma possível co-relação entre os dados devido a diferença obtida em cada variável observada. Sendo inconstante os dados em relação a densidade. Houve variações no número de isolados em cada amostragem, contudo após a normalização dos dados, os mesmos não apresentaram diferença estatística. Com exceção de Bertioga

impactado no qual bactérias foram mais freqüentes em *L. rancemosa* no inverno e em Bertioga não impactado o mesmo ocorreu, porém para a espécie *A. nitida*. Já em Cananéia o número de isolado encontrado na espécie vegetal *A. nitida* nas duas épocas avaliadas (verão e inverno) foi superior ao encontrado nas outras duas espécies vegetais avaliadas.

Pouco são os estudos com bactérias associadas a plantas de manguezais. Trabalho realizado por Vazques et al. (2000), isolou bactérias do sedimento, rizosfera e raiz de espécies de mangue. A maioria dos relatos que se têm são encontrados sobre associação de bactérias com sedimento de manguezal, (ANDO et al., 2001; MARCIAL GOMES et al., 2008; DIAS et al., 2009), deixando claro assim a necessidade de estudos sobre a comunidade bacteriana em geral e principalmente da comunidade endofítica deste ecossistema.

A comunidade microbiana pode sofrer modificação dependendo do índice pluviométrico ocorrido no período da coleta, onde nutrientes e mesmos microrganismos possam ser removidos e alterados. Segundo trabalho relatado por Almeida (2005) o elevado grau de conservação dos manguezais da Ilha do Cardoso, a alta pluviosidade e o aporte de nutrientes provenientes da drenagem de pequenos rios da região contribuíram para as diferenças encontradas em relação à quantidade de microrganismos em sedimento. Sendo assim, vários são os fatores que podem modificar a comunidade bacteriana nos mais diferentes locais e plantas, sendo necessário um estudo amplo para a compreensão de modificações ocorridas.

Em geral, dentre os isolados identificados, foi razoável a variação de espécies bacteriana endofíticas para locais, planta e época com relação a diversidade bacteriana sendo que alguns gêneros obtidos como *Enterobacter*, *Ochrobactrum*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Bacillus* (Tabela 6, 7 e 8), apresentaram um número expressivo de isolados, sendo obtidos em praticamente todos locais, plantas e época. É possível sugerir que tais gêneros possam ter grande importância no desenvolvimento da planta hospedeira, já que, boa parte dos isolados já foram relatados como atuantes na promoção de crescimento vegetal, no controle biológico de doenças de plantas, produção de auxina e solubilizadores de fosfato (STRUZ et al., 2000; VERMA et al., 2001).

Embora a identificação dos isolados tenha sido tendenciosa, feita apenas com isolados produtores de enzimas, o gênero *Bacillus* neste trabalho apresentou as maiores freqüências de isolados. Este resultado foi semelhante em trabalhos

relacionados com bactérias isoladas de sedimento de manguezal (SHOO; DHAL, 2009; DIVYA et al., 2010). Em alguns destes, ocorreram grupos bacterianos previamente descritos em ambientes marinhos e estuarinos da ordem *Vibrionales* (TROUSSELLIER et al., 2002; THOMPSON et al., 2004; SOUZA et al., 2006; DIAS et al., 2009). Este grupo de bactérias (*Vibrionales*) é conhecido como colonizador de solos, onde parece responder pouco a alterações ambientais (TAKEUCHI; HATANO, 1998; TIAGO et al., 2004; LIU et al., 2005). Contudo, mesmo sendo encontrado em sedimentos marinhos inclusive no manguezal, não foi obtido qualquer isolado desta ordem nas espécies vegetais amostrada neste trabalho. Os isolados da ordem *Vibrionales* podem ser considerados microrganismos propensos a serem isolados somente em solo, sedimentos, rizosfera e raiz. Fan et al. (2006) relataram a ocorrência dos gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus* em ambientes estuarinos, enquanto que isolados de *Staphylococcus* foram também encontrados em alta densidade em ecossistemas de manguezais (HOLGUIN; BASHAN, 1996; KATHIRESAN, 2003). Porém, no presente trabalho, foi obtida alta frequência do gênero *Bacillus* em todas as variáveis testadas.

Para avaliar a diversidade de maneira mais abrangente na comunidade avaliada seria necessário o estudo independente de plantas e locais. Este método seria uma ferramenta importante na descrição de diversidade bacteriana bem como o monitoramento de comunidades microbianas em diversos ambientes. Contudo, na maioria das vezes os microrganismos relatados por técnicas mais minuciosas não são cultiváveis por meio de cultivo normalmente usado, impossibilitando a utilização direta dos mesmos.

5.2 Produção de enzimas por bactérias endofíticas isoladas de plantas de manguezal

Por compor um ambiente ainda pouco explorado, os manguezais podem conter uma extensão da diversidade microbiana ainda em grande parte desconhecida, com isso produtos como novas enzimas e antibióticos poderiam ser encontrados. Porém há a necessidade de se isolar e cultivar tais microrganismos deste ecossistema. Fica clara a importância da estratégia de cultivo no conhecimento do potencial metabólico destes microrganismos de possível interesse aplicado.

Todas as bactérias endofíticas isoladas e estocadas nesse trabalho foram capazes de produzir algum tipo de enzima bem como solubilizar fosfato, como parte do seu metabolismo secundário (Tabelas 3 a 8). Isto revela que estes microrganismos são uma fonte com potencial para a aplicação biotecnológica em diferentes áreas, tais como produção de inoculantes, nutrição, detergentes, papel, fármacos, têxtil e indústria de couro (CARRIM et al., 2006).

O estudo do perfil enzimático *in vitro* da microbiota endofítica isolada de espécies arbóreas do manguezal da Ilha do Cardoso e dos manguezais de Bertioga, destacaram representantes dos gêneros: *Pantoea*, *Bacillus*, *Novosphingobium*, *Alcaligenes*, como principais produtores enzimáticos neste ambiente que foram capazes de produzir amilases, proteases, esterases, solubilização de fosfato e lipases (Tabelas 6, 7 e 8).

Num contexto geral, foi observada uma versatilidade metabólica nos gêneros *Pantoea* e *Bacillus*, que produziram diversas enzimas. Trabalho semelhante realizado em manguezal no México observou que as espécies *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *Paenibacillus macerans*, *Xanthobacter agilis*, *Vibrio proteolyticus*, *E. aerogenes*, *E. taylorae*, *E. asburiae*, e *Kluyvera cryocrescens* foram isolados de raiz de *Avicenia germinant*. Em *L. rancemosa* foram isoladas de raiz as espécies *B. licheniformis*, *Chryseomonas luteola* e *P. stutzeri*. Apesar da diversidade de espécies somente os gêneros *Xanthobacter*, *Kluyverae* e *Chryseomonas* foram capazes de solubilizar fosfato (VASQUEZ et al., 2000). Os resultados foram diversos em relação ao obtido neste trabalho onde vários gêneros foram capazes de solubilizar fosfato. Vários trabalhos relatam atividades enzimáticas com diferentes isolados bacterianos com maior destaque para enzimas proteolíticas, que tem grande utilidade nas indústrias de detergentes ou similares (VENUGOPAL; SARAMMA, 2006; THYS et al., 2006; GHOSH et al., 2007; LAGEIRO et al., 2007).

Também, em nosso trabalho, poucos foram os isolados com capacidade de produzir esterase, independentemente de local, época ou planta (Figuras 7, 8 e 9). Perante estes dados pode ser sugerido que as bactérias que colonizaram as plantas de manguezal não apresentaram características favoráveis para a produção de esterase. Em contra partida, foi obtida maior freqüência de isolados no local impactado (Bertioga) com atividade enzimática (Tabelas 4 a 8). Tal fato sugere que, a modificação no ambiente pelo derramamento de óleo pode ter modificado a características no metabolismo de espécies vegetais de manguezal

conseqüentemente modificando a colonização bacteriana endofítica presente como, por exemplo, características de atividade enzimática.

Em relação aos períodos de coleta, houve variação entre enzimas e plantas, mas tornando estas informações difíceis de serem correlacionadas e avaliadas de forma conjunta. As variações de temperatura, salinidade e teores de matéria orgânica podem ter influenciado a comunidade bacteriana nas épocas avaliadas. Almeida et al. (2007) avaliaram quatro estuários em estações diferentes, onde observaram que a produtividade bacteriana variou em conseqüência do teor de salinidade e dos fatores ambientais.

Dentre os microrganismos com atividade enzimática, os solubilizadores de fosfatos desempenham importante papel no suprimento de P para as plantas (SILVA FILHO; VIDOR, 2000), apresentando potencial para o uso na forma de inoculantes (SILVA FILHO et al., 2002; SOUCHIE et al., 2007). Diversos autores (KIM et al., 1998; OMAR, 1998) relatam que a solubilização de fosfato é co-relacionada com a habilidade de produção de ácidos orgânicos e/ou polissacarídeos extracelulares pelos microrganismos. Diversos microrganismos podem solubilizar P em meio de cultura *in vitro* (WAKELIN et al., 2004; HARA, 2005; SOUCHIE et al., 2006). Quando um microrganismo dissolve o fósforo em meio de cultura sólido contendo fosfato de cálcio há formação de uma zona de clarificação ao redor da colônia, correspondente à acidificação do meio e dissolução do fósforo (KANG et al., 2002).

A solubilização de fosfato pelas bactérias endofíticas isoladas no presente trabalho, revelaram potencial para serem utilizadas como inoculantes em culturas agrícolas de interesse. Estudos futuros são interessantes a fim de testar a capacidade solubilizadora de distintas fontes fosfatadas por estes microrganismos, sob condições *in vitro* e posteriormente testes *in vivo* (Tabelas 3, 4 e 5).

5.3 Fixação de N₂ por bactérias endofíticas isoladas de manguezal

Foi observado no presente trabalho que 47% dos isolados avaliados apresentaram a capacidade de fixar nitrogênio (Figura 10). A formação de halo comprovando a fixação de nitrogênio foi observada tanto no meio semi-sólido de NFb de pH básico (de cor verde sem alteração do pH proposto pela metodologia) quanto no meio de cultura com o pH ácido (de cor azul indicando a acidificação do meio NFb semi-sólido) (Figuras 11, 12 e 13). No trabalho realizado por Assumpção

et al. (2009) de 62 isolados bacterianos de soja avaliados observou que apenas 11 (18%) foram capazes de fixar nitrogênio. Em trabalho realizado por Teixeira et. al. 2007 em mandioca, foi feita a coleta e avaliação de amostras em três diferentes estados brasileiros. O maior percentual foi visto no estado de Amazonas com 36% dos isolados testados sendo fixador de N₂. Já Cerigioli et al. (2005), de 86 isolados bacterianos endofíticos em milho, 76 apresentaram esta atividade mediante ao teste com meio semi-sólido de NFb.

No presente trabalho, foi observado grande número de *B. pumilus* e *P. agglomerans* com a capacidade de fixar nitrogênio (Tabelas 6 a 9). No trabalho de Teixeira (2007) no estado de São Paulo o gênero *Bacillus* teve destaque por ser o gênero que mais apresentou isolados com tal característica. Em trabalho realizado por Hubner et al. (2004), foi observado várias espécies de *Bacillus* com capacidade de crescimento em meio NFb: *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus* e *B. firmes*. A espécie *B. safensis* obtida em nosso trabalho, como possível fixadora de nitrogênio, até o momento, ainda não foi citada na literatura como fixadora de nitrogênio. Há poucos relatos de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Pantoea*. Trabalho realizado por Loiret et al. (2004), foi o primeiro a citar o gênero *Pantoea* como uma endofítica fixadora de nitrogênio, isolada de cana-de-açúcar.

Em nosso trabalho foi verificada fixação de N₂ com as espécies *P. agglomerans* e *P. dispersa*, sendo que esta última ainda não foi relatada como endofítica fixadora de nitrogênio.

O estudo de bactérias endofíticas diazotróficas é recente e vem crescendo gradativamente. As informações sobre este assunto são poucas e mais estudos devem ser conduzidos para elucidar a forma e o local de colonização para a atividade de fixação de nitrogênio entre a interação planta-microrganismo.

5.4 Produção de AIA por bactérias endofíticas isoladas de manguezal

Por meio das análises qualitativas foi obtido um total de 41 isolados que foram capazes de sintetizar este hormônio, apresentando resultado positivo tanto para as análises quantitativas como qualitativas (Figuras 14 e 15). Porém, o resultado negativo na análise qualitativa nem sempre condiz com o resultado da análise quantitativa. Verificou-se que Cananéia foi o local com maior percentual de

isolados produtores de AIA em relação aos outros locais. E muitos deles possuem altos valores para a síntese de AIA ainda não descritos com a metodologia utilizada (Tabelas 6, 7 e 8). Destacando-se o isolado com maior valor foi $760,7\mu\text{g.mL}^{-1}$ (*Exiguobacterium sibiricum*) presente no manguezal de Cananéia. Apesar de valores expressivos, algumas bactérias de mesma espécie apresentaram valores distintos. Algumas justificativas podem ser apresentadas para explicar as causas mais prováveis. A quantidade de triptofano pode interferir na síntese de AIA, porque cada linhagem apresenta uma concentração ótima (BAR; OKON, 1993). Outro fator que interage na produção de AIA é a fonte de carbono e a quantidade do mesmo (FUENTES- RAMIREZ et al., 1993). Bastián et al. (1998) observaram diferentes valores de AIA produzidos pela bactéria *Acetobacter diazotrophicus* quando quantidades diferentes de sacarose eram adicionadas ao meio de cultura, sendo que alguns valores eram nulos. Observou-se também que, isolados de uma mesma espécie presente de locais diferentes produziram quantidades distintas de AIA. Sabe-se que o AIA bacteriano é obtido na fase estacionária, sendo o mesmo, um metabólito secundário, porém a duração desta fase varia de espécie para espécie. Logo, para conhecer o crescimento de cada espécie e assim a sua fase estacionária, é necessário fazer uma curva de crescimento de cada isolado mediante a relação de densidade de células por tempo. Devido ao grande número de isolados para a realização deste teste, foi inviável o ajuste da leitura da fase estacionária bem como a obtenção da curva de crescimento de cada espécie, considerando que foram usados 115 isolados.

5.5 Produção de crescimento vegetal

Endofíticos já são descritos como promotores de crescimento vegetal devido à capacidade de algumas bactérias em solubilizar fosfato, produzir auxinas e fixar nitrogênio (VERMA et al. 2001; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004, MENDES et al., 2007).

5.5.1 Promoção de crescimento em cana-de-açúcar

Neste trabalho os isolados avaliados (Tabela 9) não promoveram crescimento vegetal, ou a relação era neutra ou apresentavam efeito negativo no desenvolvimento das plântulas. Apesar de todos apresentarem bons resultados para os testes que justifiquem a promoção de crescimento.

Trabalho realizado por Canbolat et al. (2006) relataram a inoculação no solo com *Bacillus* spp. o qual demonstrou a capacidade de solubilizar fosfato, resultando em maior desenvolvimento vegetal. Em trabalho realizado por Dias et al. (2008), com plantas de morango, foram utilizados isolados do gênero *Bacillus* spp. para verificar a promoção de crescimento vegetal para esta cultura. Os resultados obtidos por este autor mostrou que as linhagens testadas em relação ao comprimento das raízes não foram superiores aos do controle. O resultado obtido por estes autores assemelha-se com o obtido em nosso trabalho, onde apesar da bactéria *B. pumilus* apresentar valores expressivos para os testes que envolvem promoção de crescimento, não proporcionou os mesmos resultados em plântulas de cana de açúcar (Tabela 10).

Outro isolado que apresentou resultado negativo foi o isolado MBIL 2.33 (Tabelas 9 e 10) (*P. agglomerans*). Esta bactéria já foi relatada por sua importância agrônômica devido ao potencial da mesma na promoção de crescimento vegetal (VERMA et al., 2001; SUBARAN et al., 2009; QUECINE et al., 2010); no controle de fitopatôgenos (BARDIN et al., 2003). Baldini et al. (1997), classificaram a espécie *P. agglomerans* como sendo diazotrófica facultativa, já que é encontrada tanto em rizosfera quanto no interior da planta. Trabalho realizado por Quecine (2010) com *P. agglomerans* inoculada também em cana-de-açúcar, verificou promoção de crescimento vegetal em duas variedades de cana. Em uma variedade foi observado o aumento significativo da massa seca na parte aérea e na outra variedade o aumento foi significativo tanto na parte aérea quanto na raiz.

Apesar de todos os relatos favorecerem a espécie *P. agglomerans* na promoção de crescimento, em nosso trabalho ela não promoveu crescimento, apesar de ter apresentado todas as características para ser considerada uma espécie com potencial biotecnológico para crescimento vegetal. Inclusive os índices de produção de AIA obtidos pela espécie *P. agglomerans* isolada de plantas de manguezal foi superior ao encontrado por Quecine (2010) que foi de aproximadamente $100\mu\text{g. mL}^{-1}$. O isolado utilizado pela autora citada foi obtido de

eucalipto e o mesmo proporcionou o crescimento vegetal em cana-de-açúcar. Em nosso trabalho o isolado foi obtido de plantas de manguezal, e inoculado em cana-de-açúcar que é uma gramínea. Pode-se inferir que a inoculação da bactéria *P. agglomerans* isolada de eucalipto proporcionou uma interação benéfica na cana de açúcar, diferentemente do isolado obtido em plantas de manguezal. Pode ser sugerido também, que as condições ambientais nas quais as plântulas de cana-de-açúcar foram mantidas com variação de temperatura e falta de umidade no ambiente em nosso trabalho, podem ter influenciado os resultados.

5.5.2 Promoção de crescimento em monjoleiro

Os resultados obtidos pelos isolados nos tratamentos avaliados promoveram crescimento vegetal. Quando o inoculo 2 foi utilizado foi observado resultado positivo em relação ao controle no aumento da matéria fresca e seca (parte aérea) e na matéria fresca (raiz) (Tabela 11) (Figura 17). Nestas variáveis, foi observado que o crescimento do tratamento com inóculo 2 era melhor do que das testemunhas. Este isolado apresentou tendência no aumento de massa fresca e seca da parte aérea e fresca da raiz. A utilização de consórcios em algumas variáveis mostrou melhores resultados inclusive comparado com o tratamento onde eram realizadas as adubações normais feita pela empresa. Apesar da estatística não apresentar significância os resultados obtidos mostraram que os valores de alguns tratamentos foram semelhantes aos do controle demonstrando assim que a substituição da adubação química pela inoculação de isolados pode trazer benefícios e economia à empresa.

Trabalho realizado por Assumpção et al. (2009) em estudo sobre promoção de crescimento em soja, demonstrou efeito negativo com o isolado *Enterobacter* sp., para a massa da matéria fresca de raiz e do total da planta.

Poucos são os relatos sobre a utilização de bactéria endofíticas na promoção de crescimento em plantas arbóreas. Alguns trabalhos apontam o envolvimento de bactérias na promoção do desenvolvimento do sistema radicular de várias culturas (DIAS et al., 2008; ADESEMOYE et al., 2008; KUKLINSK-SOBRAI et al., 2004). Mafia et al. (2007) realizou trabalho com rizobactérias inoculadas em substrato de mudas de eucalipto. Em trabalho realizado com *Pinus elliottii in vitro* foi observado o enraizamento dos explantes produzidos por uma bactéria não identificada,

proporcionando de 15% a 90% em relação à testemunha (BURNS; SCHWARZ, 1996).

No setor florestal o tempo de rotação é muito longo, logo a inoculação de microrganismos a fim de acelerar o desenvolvimento acaba tendo uma resposta a longo prazo também. Porém, é interessante visar o início da produção das mudas onde a inoculação com microrganismos pode favorecer o: aumento do índice de sobrevivência das plântulas, seu estabelecimento precoce no campo após o plantio, a melhoria na qualidade e características do sistema radicular, que são vantagens desejáveis para uma melhor produção.

Com este trabalho ficou demonstrado o efeito das bactérias endofíticas sobre as plântulas do monjoleiro o que afeta a qualidade das plântulas produzidas, melhoria no desenvolvimento e possível economia na adubação química realizada pela empresa. A estratégia de produção de mudas pelo tratamento de inoculação de microrganismo através do substrato, aparentemente constitui uma estratégia vantajosa e com resultados consistentes conforme observado neste trabalho.

Os resultados obtidos neste trabalho são inéditos, já que não há relatos de bactérias endofíticas isoladas de manguezal e utilizadas na promoção de crescimento vegetal de uma gramínea, nem de uma planta de reflorestamento. Com a metodologia utilizada para a verificação da produção de AIA, os isolados apresentaram altos valores ainda não descritos. Vale ressaltar a necessidade de mais estudos para verificar o quanto a interação de uma espécie bacteriana e seu hospedeiro pode modificar a ação metabólica da mesma resultando em diferentes resultados como visto neste trabalho. Torna-se oportuna a necessidade de mais testes com estes isolados devido aos resultados expressivos obtidos, demonstrando uma viabilidade de aplicação biotecnológica como inoculantes.

6. CONCLUSÕES

- a) A metodologia utilizada para o isolamento de bactérias de 3 espécies vegetais de manguezais foi eficiente, mas devido a amplitude do isolamento e diferentes etapas de coleta, os resultados apresentaram grande variação dificultando o estabelecimento de resultados que, em geral, propiciassem diferenças significativas quanto a época de isolamento e diferenças entre as espécies vegetais estudadas.
- b) A comunidade bacteriana endofítica cultivável de manguezal foi constituída por diferentes espécies bacterianas: *Alcaligenes* sp., *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *Brevundimonas* sp., *Chryseobacterium* sp., *Curtobacterium* sp., *Enterobacter* sp., *E. cyripedii*, *Erythrobacter* sp., *E. sibiricum*, *Novosphingobium* sp., *O. anthropi*, *P. agglomerans*, *P. fluorescens*, *S. caprae*, *S. maltophilia*, *X. campestris*. Este é o primeiro estudo de comunidade bacteriana endofítica em manguezal,
- c) Dentre os isolados obtidos e estudados, o gênero *Bacillus* foi o mais freqüente, sendo obtido nos três locais avaliados,
- d) Baseado nos ensaios *in vitro*, os isolados avaliados apresentaram atividade para as enzimas: amilase, protease, lípase, endoglicanase, fosfatase e a síntese de AIA, fixação de nitrogênio, mostrando assim o seu potencial biotecnológico. Em contra partida, as bactérias endofíticas testadas praticamente não apresentaram atividade para a enzima esterase. As maiores atividades enzimáticas foram observadas para endoglicanase e fosfatase (solubilização de fosfato),
- e) No experimento em casa de vegetação com cana-de-açúcar não houve promoção de crescimento. Em monjoleiro foi constatado no tratamento em que foi utilizado o inóculo 2 a promoção de crescimento em relação ao controle utilizado, demonstrando assim que a interação endófito-planta pode trazer benefícios para o hospedeiro, podendo resultar em melhor desenvolvimento para a planta.

REFERÊNCIAS

- ABEL, S.; OELLER, P. W.; THEOLOGIS, A. Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 91, p. 326-330, 1994.
- ABREU-TARAZI, M. F.; NAVARRETE, A. A.; ANDREOTE, F. D.; ALMEIDA, C. V., TSAI, S. M.; ALMEIDA, M. Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated "axenic" pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 555-560, 2010.
- ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOPPER, J. W. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 54, n. 10, p. 876-886, 2008.
- ALMEIDA M. A.; CUNHA M. A.; DIAS J. M. Bacterial productivity distribution during a rainy year in an estuarine system. **Microbial Ecology**, New York, v. 53, p. 208-220, 2007.
- ALMEIDA, R. **Ecologia de Manguezais: Dinâmica da Serapilheira e Funcionamento do Ecossistema**, Ilha do Cardoso, Cananéia, São Paulo, Brasil. 2005. 182 p. Tese (Doutorado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- ALONGI, D. M. Bacterial productivity and microbial biomasses tropical mangrove sediments. **Microbial Ecology**, New York, v. 15, p. 59-79, 1988.
- ALONGI, D. M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Environmental Conservation**, Lausanne, v. 29, p. 331-349, 2002.
- ANDO, Y.; MITSUGI, N.; YANO, K.; HASEBE, Y.; KARUBE, I. Initial fermentation of sea sludge using aerobic and thermophilic microorganisms in a mangrove soil. **Bioresource Technology**, Essex, v. 80, p. 83-85, 2001.
- ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, p. 447-451, 2000.
- ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.
- ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, 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**, Washington, DC, v. 68, p. 4906-4914, 2002.

ASSUMPÇÃO, L. C.; LACAVA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. cap. 4, p. 117-137.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Org.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 189-207.

BAI, Y.; DÁOUST, F.; SMITH, D. L.; DRISCOLL, B. T. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 230-238, 2002.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.

BANO, N.; NISA, M. U.; KHAN, N.; SALEEM, M.; HARRISON, P. J.; AHMED, S. I.; AZAM, F. Significance of bacteria in the flux of organic matter in the tidal creeks of the mangrove ecosystem of the Indus River Delta, Pakistan. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf, v. 157, p. 1-12, 1997.

BAR, T.; OKON, Y. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, p. 81-86, 1993.

BARDIN, S. D.; HUANG, H. C.; LIU, L.; YANKE, L. J. Control, by microbial seed treatment, of damping-off caused by *Pythium* sp. On canola, safflower, dry pea, and sugar beet. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 25, p. 268-275, 2003.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, p. 2043-2050, 2000.

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 24, p. 7-11, 1998.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 137, p. 111-117, 1991.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 57, p. 535-538, 1991.

BUGBEE, W. M.; COLE, D. F.; NIELSEN, G. Microflora and invert sugar in juice from healthy tissue of sugarbeets. **Applied Microbiology**, Baltimore, v. 29, p. 780-781, 1975.

BURG, S. P.; BURG, E. A. The interaction between auxin and ethylene and its role in plant growth. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 55 p. 262-269, 1966.

BURNS, J. A.; SCHWARZ, O. J. Bacterial stimulation of adventitious rooting on *in vitro* cultured slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) seedling explants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 15, p. 405-408, 1996.

CANBOLAT, M.; BILEN, S.; ÇAKMAKÇI, R.; SAHIN, F.; AYDI, A. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seeding growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 42, n. 3, p. 350-357, 2006.

CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 3, p. 353-359. 2006.

CERIOLIOLI, M. M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento**. 2005. 132 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Ciências Sociais e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

CHANDRASEKARAN, M. Industrial enzymes from marine microorganisms: The Indian scenario. **Journal of Marine Biotechnology**, New York, v. 5, p. 86–89, 1997.

CHANWAY, C. P. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. **Sydowia**, Innsbruck, Austria, v. 50, p. 149-170, 1998.

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

DEMASON, D. A. Auxin-cytokinin and auxin-gibberellin interactions during morphogenesis of the compound leaves of pea (*Pisum sativum*). **Planta**, Berlin, v. 32, p. 1432-2048, 2005.

DIAS, A. C. F. **Diversidade de bactérias do sedimento de manguezal da Ilha do Cardoso – Cananéia – São Paulo** 2008. 61 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantã/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DIAS, A. C. F.; COSTA, F. E. C.; ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; TEIXEIRA, M. A.; ASSUMPÇÃO, L. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 189-195, 2009.

DIVYA, B.; SOUMYA, K. V.; NAIR, S. 16SrRna and enzymatic diversity of culturable bacteria from the sediments of oxygen minimum zone in the Arabian Sea. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 98, p. 9-18 2010. DOI 10.1007/s10482-010-9423-7

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60 p.

EKLÖF, S.; ASTOT, C.; SITBON, F.; MORITZ, T.; OLSSON, O.; SANDEBERG, G. Transgenic tobacco plants co-expressing *Agrobacterium iaa* and *ipt* genes have wild-type hormone levels but display both auxin and cytokinin-overproducing phenotypes. **Plant Journal**, Oxford, v. 23, p. 279-284, 2000.

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

FAN, L. F.; SHIEH, W. Y.; WU, W. F.; CHEN, C. P. Distribution of nitrogenous nutrients and denitrifiers strains in estuarine sediment profiles of the Tanshui River, northern Taiwan. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 69, p. 543-553, 2006.

FELLER, I. C.; SITNIK, M. (Ed.). **Mangrove ecology**. A manual for a field course: A Field Manual Focused on the Biocomplexity on Mangrove Ecosystems. Washington, DC: National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, 1996. 145 p.

FERREIRA, A.; QUECINE, M. C.; LACAVA, P. T.; ODA, S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 287, n. 1, p. 8-14, 2008.

FERREIRA, T. O. **Processos pedogenéticos e bioquímica de F e S em solos de manguezais**. 2006. 141 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

FORNASIER FILHO, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 273 p.

FROMMEL, M. I.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. Growth enhancement and development modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a non-fluorescent *Pseudomonas* sp. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, p. 928-936, 1991.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indole-acetic producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 154, p. 145-150, 1993.

GAI, C. S.; LACAVA, P. T.; QUECINE, M. C.; AURIAC, M. C.; LOPES, J. R. S.; ARAÚJO, W. L.; MILLER, T. A.; AZEVEDO, J. L. Transmission of *Methylobacterium mesophilicum* by *Bucephalagonia xanthophis* for paratransgenic control strategy of Citrus Variegated Chlorosis. **The Journal of Microbiology**, Heidelberg, v. 47, n. 4, p. 448-454, 2009.

GHOSH, A.; MAITY, B.; CHAKRABARTI, K.; CHATTOPADHYAY, D. Bacterial diversity of east Calcutta wet land area: possible identification of potential bacterial population for different biotechnological uses. **Microbial Ecology**, New York, v. 54, p. 452-459, 2007.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 245, p. 83-93, 2002.

HALDA-ALIJA, L. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 49, n. 12, p. 781-787, 2003.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, Lancaster, v. 67, p. 597-607, 1975.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, n. 7, p. 667-672, 2005.

HINTON, D. M.; BACON, C. W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 129, p. 117-125, 1995.

HOLGUIN, G.; BASHAN, Y.; nitrogen-fixation by *azospirillum brasilense* cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*staphylococcus* sp.). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 1651-1660, 1996.

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**, Berlin, v. 33, p. 265-278, 2001.

- HUBNER, A. P. **Identificação de bactérias diazotróficas endofíticas do grupo *Bacillus* associado a raízes de plantas de arroz irrigado**. 2004. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.
- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M.; KELLEMBERGER, E. Root colonizing and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in glasses. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 176, p. 1913-1923, 1994.
- JACOBS, M. J.; BUGBEE, W. M.; GABRIELSON, D. A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 63, p. 1262-1265, 1985.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 13, p. 390–397, 2002.
- KANG, S. C.; HA, C. G.; LEE, T. G.; MAHESHWARI, D. K. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soilinhabiting fungus *Fomitopsis* sp. PS 102. **Current Science**. Bangalore, v. 82, n. 4, p. 439-442, 2002.
- KATHIRESAN, K. Polythene and plastic-degrading microbes in an Indian mangrove soil. **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, Costa Rica, v. 51, p. 629-633, 2003.
- KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, London, v. 40, p. 81-25, 2001.
- KIM, K. Y.; JORDAN, D.; MCDONALD, G. A. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 26, p. 79-87, 1998.
- KRISHNAN, K. P.; FERNANDES, S. O.; CHANDAN, G. S.; BHARATHI, P. A. L. Bacterial contribution to mitigation of iron and manganese in mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 54, p. 1427-1433, 2007.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, New York, v. 6, p. 1244-1251, 2004.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 273, n. 12, p. 91-99, 2005.
- LACERDA, L. D. Os manguezais do Brasil. In: VANNUCCI, M. **Os manguezais e nós**. São Paulo: Editora da USP, 2003.
- LAGEIRO, M. M.; MOURA, M. J.; REIS, A.; FERREIRA, M. J. C. Microbial proteases application in leather industry. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 131, p. 211-241, 2007.

LIU, J.; NAKAYAMA, T.; HEMMI H.; ASANO, Y.; TSURUOKA, N.; SHIMOMURA, K.; NISHIJIMA, M.; NISHINO, T. *Microbacterium natoriense* sp. nov., a novel D-aminoacylase-producing bacterium isolated from soil in Natori, Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 661–665, 2005.

LIU, Z.; PILLAV, V.; NOWARK, J.; ZHY-DE, W. *In vitro* culture of watermelon and cataloupe with and without beneficial bacterium. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 402, p. 58-60, 1995.

LOIRET, F. G.; ORTEGA, E.; KLEINER, D.; ORTEGA-RODE, P.; RODE'S, R. DONG, Z. A putative nem endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. From sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p. 504-511, 2004.

MADHAIYAN, M.; SARAVANAN, V. S.; JOVI, D. B.; LEE, H.; THENMOZHI, R.; HARI, K.; SA, T. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 159, n. 3, p. 233-243, 2004.

MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W.; VAN VUURDE, J. W. L.; VAN DER WOLF, J. M.; VAN DEN BRINK, M. Endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Pseudomonas fluorescens* strain 89b-27 and *Enterobacter asburiae* strain JM22. In: RYDER, M. H.; STEPHENS, P. M.; BOWEN, G. D. **Improving plant productivity in rhizosphere bacteria**. Melbourne: CSIRO, 1997. p. 180.

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

MARTINY, J. B. H.; BOHANNAN, B. J. M.; BROWN, J. H.; COLWELL, R. K.; FUHRMAN, J. A.; GREEN, J. L.; HORNER-DEVINE, M. C.; KANE, M.; KRUMINS, J. A.; KUSKE, C. R.; MORIN, P. J.; NAEEM, S.; OVREAS, L.; REYSENBACH, A.; SMITH, V. H.; STALEY, T. Microbiol biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature**, London, v. 4, p. 102-112, 2006.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor Biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Org.) **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: UFPE, 2007. p. 129-140.

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, Lancaster, v. 80, p. 808-811, 1990.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLO, F.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G.; FANI, R. Flutuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, p. 105-114, 2003.

MORGAN, P. W. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the production of ethylene by cotton and grain sorghum. **Physiologia Plantarum**, København, v. 15, p. 420-427, 1962.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; SESHADRI, S.; LAKSHMINARASIMHAN, C. *Gluconacetobacter diazotrophics* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, Bangalore, v. 83, p. 137-145, 2002.

NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 1998. cap. 1, p. 21-44.

NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 3-8.

NORDSTRÖM, A.; TARKOWSKA, P.; TARKOWSKA, D.; NORBAEK, R.; ASTOT, C.; DOLEZAL, K.; SANDBERG, G. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 101, p. 8039-8044, 2004.

OMAR, A. M. N.; WEINHARD, P.; BALANDREAU, J. Using the spermosphere model technique to describe the dominant nitrogen-fixing microflora associated with wetland rice in two Egypt soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 7, p. 158-163, 1989.

PASCHOLATI, S. F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. v.1 Princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. p. 343-364.

PEDRAZA, R. O.; RAMIREZ-MATA, A.; XIQUI, M. L.; BACA, B. E. Aromatic amino acid aminotransferase activity and índole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bactéria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 233, n. 1, p. 15-21, 2004.

PEIXOTO-NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biociência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 29, p. 62-76, 2002.

PEREIRA, J. O.; CARNEIRO-VIEIRA, M. L.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 15, p. 37-40, 1999.

POLYMENAKOU, P. N.; BERTILSSON, S.; TSELEPIDES, A.; STEPHANOU, E. G. Bacterial community composition in different sediments from the Eastern Mediterranean Sea: a comparison of four 16S ribosomal DNA clone libraries. **Microbial Ecology**, New York, v. 50, p. 447-462, 2005.

PRAYITHO, J.; STEFANIAK, J.; MCIVER, J.; WEINMAN, J. J.; DAZZO, F. B.; LADHA, J. K.; BARRAQUIO, W.; YANNI, Y. G.; ROLFE, B. G. Interactions of rice seedlings with bacteria isolated from rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 26, p. 521–535, 1999.

PROCÓPIO, R. E. L. **Diversidade bacteriana endofítica de *Eucalyptus* spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: localization and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 254-259, 1997.

QUECINE, M. C. **Aspectos biotecnológicos da interação entre bactérias e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. L.)**. 2010. 196 p. Tese de (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPAND, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 62, p. 597-635, 1998.

RAUPACH, G. S.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, Lancaster, v. 88, p. 1158-1164, 1998.

REED, G. **Enzymes in food processing**. 2. ed. Wisconsin: Academic Press, 1975. 573 p.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, p. 319-339, 1999.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.

ROSS, J. J.; O'NEILL, D. P.; SMITH, J. J.; KERCKHOFFS, L. H. J.; ELLIOT, R. C. Evidence that auxin promotes gibberellins A biosynthesis in pea. **Plant Journal**, Oxford, v. 21, p. 547-552, 2000.

SAHOO, K.; DHAL, N. K. Potential microbial diversity in mangrove ecosystems: A review. **Indian Journal of Marine Sciences**, New Delhi, v. 38, n. 2, p. 249-256 2009.

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

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 19, p. 627–662, 2001.

SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C. P. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 191-196, 1999.

SIERRA, G. A. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 28, p. 15-22, 1957.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de Pinus e Eucalyptus de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, p. 847-854, 2002.

SILVA, C. A. R.; SMITH, B. D.; RAINBOW, P. S. Comparative biomonitors of coastal trace metal contamination in tropical South America (N. Brazil). **Marine Environmental Research**, Barking, v. 61, p. 439-455, 2006.

SKOOG, F.; MOLEIRO, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-131, 1957.

SOUCHIE, E. L.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JUNIOR, O. J. E DA SILVA, E. M. R. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, p. 1149-1152, 2005.

SOUSA, O. V.; MACRAE, A.; MENEZES, F. G. R.; GOMES, N. C. M.; VIEIRA R. H. S. F.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 52, p. 1725-1734, 2006.

STRALHER, A. N.; STRALHER, A. H. **Geografia física**. 3. ed. Barcelona: Omega, 2000. 550 p.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILHO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganism. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 67, p. 257-268, 2004.

STRUZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 25, p. 13-19, 1997.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 162-167, 1998.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, p. 1-30, 2000.

SULBARAN, M.; PÉREZ, E.; BALL, M. M.; BAHASAS, A.; YARZABAL, L. A. Characterization of the mineral phosphate-solubilizing activity of *Pantoea agglomerans* MMB051 isolated from an iron-rich soil in Southeastern Venezuela (Bolívar State). **Current Microbiology**, New York, v. 58, p. 378-383, 2009

TAKEUCHI, M.; HATANO K. Proposal of six new species in the genus *Microbacterium* and transfer of *Flavobacterium marinotypicum* ZoBell and Upham to the genus *Microbacterium* as *Microbacterium maritypicum* comb. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, DC, v. 48, p. 973–982, 1998.

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

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

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E. C.; HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, p. 43-49, 2007.

THOMPSON, J. R.; RANDA, M. A.; MARCELINO, L. A.; MITCHELL, A. T.; LIM, E.; POLZ, M. F. Diversity and Dynamics of a North Atlantic Coastal *Vibrio* Community **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 6, p. 4103–4110, 2004.

THYS, R. C. S.; GUZZON, S. O.; OLIVERA, F. C.; BRANDELLI, A. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 67–73, 2006.

TIAGO, I.; CHUNG, A. P.; VERISSIMO, A. Bacterial diversity in a nonsaline alkaline environment: heterotrophic aerobic populations. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 12, p. 7378–7387, 2004.

TROUSSELLIER M.; SCHAFER H.; BATAILLER N.; BERNARD L.; COURTIES C.; LEBARON P.; MUYZER G.; SERVAIS P.; VIVES-REGO J. Bacterial activity and genetic richness along an estuarine gradient (Rhône River plume, France). **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf, v. 28, p. 13-24, 2002.

TRÜPER H. G. Prokaryotes: an overview with respect to biodiversity and environmental importance. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 1, p. 227-236, 1992.

TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; KLIMOVA, S. Y.; SHESTAKOV, A. I.; BOTINA, S. G.; NETRUSOV, A. I. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 188, p. 655-664, 2007.

VANNUCCI, M. **Os manguezais e nós: uma síntese de percepções**. São Paulo: EDUSP, 1999. 233 p.

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

VENUGOPAL, M.; SARAMMA, A. V. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 1239–1243, 2006.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 127-141, 2001.

WAKELIN, S. A.; WARREN, R. A.; HARVEY, P. R.; RYDER, M. H. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 40, p. 36-43, 2004.

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, Madison, v. 69, p. 99-151, 2000.

WHITMAN W. B.; COLEMAN D. C.; WIEBE W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WOODHOUSE, W. W.; SENECA, E. D.; BROOME, S. W. **Propagation of Spartina Alterniflora for substrate stabilization and salt-marsh development**. Fort Belvoir: U.S. Army Coastal Engineering Research Center, 1974. 155 p.

ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 539-554, 2003.

ZHOU, H. W.; GUO, C. L.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 262, p. 148-157, 2006.