

EDUARDO PENTEADO GOTTARDO

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS
DE MANGUE VERMELHO (*Rhizophora mangle*) E AVALIAÇÃO
DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação (Mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo (USP)/ Instituto Butantan/Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

SÃO PAULO
2009

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS
DE MANGUE VERMELHO (*Rhizophora mangle*) E AVALIAÇÃO
DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

EDUARDO PENTEADO GOTTARDO

Dissertação (Mestrado) apresentada
ao Programa de Pós-graduação
Interunidades em Biotecnologia da
Universidade de São Paulo (USP)/
Instituto Butantan/Instituto de
Pesquisas Tecnológicas (IPT), para
obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Itamar Soares de Melo

SÃO PAULO
2009

RESUMO

GOTTARDO, E.P. **Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas de mangue vermelho (*Rhizophora mangle*) e avaliação do potencial biotecnológico**. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2009.

Manguezais são considerados ecossistemas costeiros, localizados na transição entre os ambientes terrestre e marinho. Esse ambiente é característico de regiões tropicais e subtropicais, sendo encontrados em todo o mundo, principalmente no Brasil, Indonésia e Austrália. Em nosso país, os manguezais podem ser encontrados desde o Amapá até o sul de Santa Catarina apresentando, quase sempre, condições propícias para alimentação, proteção e reprodução da biodiversidade existente no ecossistema. A ocorrência de grande quantidade de matéria orgânica potencializa o fato de que os microrganismos são importantíssimos na ciclagem de nutrientes nestes ambientes. A maioria destes microrganismos transforma a vegetação morta em nutrientes que podem ser utilizados pelas plantas, reciclando e dando continuidade ao fluxo orgânico de um manguezal. A Fixação Biológica de Nitrogênio é o processo através do qual microrganismos existentes efetuam a redução do N_2 atmosférico à amônia, processo catalisado pelo complexo enzimático da nitrogenase. Esses microrganismos, quando endofíticos, fixam o N_2 atmosférico “*in planta*” e transferem os produtos para o hospedeiro, demonstrando grande potencial como diazotróficos. Microrganismos endofíticos podem ser extremamente relevantes para os vegetais existentes em manguezais por habitarem o interior destes, em todo seu ciclo de vida ou somente em parte dele, sem prejudicá-lo ou causar qualquer dano aparente ao mesmo. Os endofíticos podem conferir ao seu hospedeiro características importantes, tais como, maior resistência a condições de estresse, alterações nas condições fisiológicas, suprimento de nutrientes, produção de reguladores de crescimento vegetal e outros componentes de interesse biotecnológico (como enzimas, antibióticos e drogas de interesse farmacêutico). O presente estudo visou, assim, verificar a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas existentes em mangue vermelho (*Rhizophora mangle*) da Ilha do Cardoso (Cananéia – SP) e estudar a biodiversidade funcional dos principais grupos e potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Microrganismo endofítico; Bactérias diazotróficas; Mangue vermelho; Manguezal; *Rhizophora mangle*.

ABSTRACT

GOTTARDO, E.P. **Diversity of endophytic diazotrophic bacteria of red mangrove (*Rhizophora mangle*) and evaluation of the biotechnological potential.** 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2009.

Mangroves are considered a coastal ecosystem, located in the transition between the terrestrial and marine environments. This environment is typical of tropical and subtropical regions and is found throughout the world, mainly in Brazil, Indonesia and Australia. In our country, the mangroves can be found from the Amapá to the south of Santa Catarina showing, almost always, conditions for feeding, breeding and protection of biodiversity in the ecosystem. The occurrence of a large amount of organic matter enhances the fact that microorganisms are important in the cycling of nutrients in these environments. Most of these microorganisms transform the dead vegetation in nutrients that can be used by plants, recycling and giving continuity to the organic flow of a mangrove. The biological nitrogen fixation is the process by which microorganisms existing perform the reduction of atmospheric N₂ to ammonia, process catalyzed by the nitrogenase enzyme complex. These microorganisms, when endophytic, determine the atmospheric N₂ "in plant" and transfer the products to the host, showing great potential as diazotrophic. Endophytic microorganisms can be extremely relevant to the plant existing in mangrove swamps, because live in the interior of these, in its entire life cycle or only part of it, not harm him or cause any apparent damage to it. The endophytic can give to your host important characteristics such as greater resistance to conditions of stress, changes in physiological conditions, supply of nutrients, production of plant growth regulators and other components of biotechnological interest (such as enzymes, antibiotics and drugs of pharmaceutical interest) . This paper therefore finds the diversity of endophytic diazotrophic bacteria exist in red mangrove (*Rhizophora mangle*) of Ilha do Cardoso (Cananéia - SP) and study the functional biodiversity of the main groups and potential biotechnology.

Key words: Endophytic microorganism; Diazotrophic bacteria; Red mangrove; Mangrove; *Rhizophora mangle*.

INTRODUÇÃO

O manguezal é um ecossistema particular, restrito às zonas entre marés de litorais e ilhas, associados a estuários, baías e lagunas. Estão localizados estrategicamente protegidos dos impactos dos ventos e ondas, onde a salinidade situa-se entre 5 a 30% podendo atingir até 90%.

Este ecossistema pode ser encontrado em regiões tropicas e subtropicais do mundo inteiro, sendo Indonésia, Brasil, Austrália e Nigéria os países onde se encontram a maior quantidade de manguezais, chegando a cerca de 50% da área total de manguezais existentes no mundo, que é de 181.000 Km².

Por serem ambientes de ligação, ou seja, interface entre o continente, oceano e atmosfera, os manguezais apresentam um solo rico em matéria orgânica proveniente das terras continentais e das bacias hidrográficas que acessam a zona costeira pelas chuvas e pelos rios. São considerados áreas de preservação permanente e verdadeiros santuários ecológicos, abrigando uma das maiores biodiversidades em termos de reprodução de espécies. Funcionam como filtro para o ambiente, fornecendo vários nutrientes para as espécies e colaborando com o enriquecimento de ambientes próximos com sais minerais e matéria orgânica. Sua importância ecológica e econômica torna-o um ambiente atrativo e procurado. Porém, este ecossistema é considerado de grande vulnerabilidade, pois têm sofrido em sua ampla distribuição, ações antrópicas de impactação negativa do ambiente.

A manutenção dos mangues aparece, entretanto, como um desafio para a maioria dos países, somente nos últimos 50 anos, aproximadamente um terço das florestas de mangues foram perdidas, e assim possivelmente inúmeras espécies, principalmente microrganismos com grande potencial biotecnológico e de reestruturação ambiental. Surpreendentemente, quase nenhuma pesquisa tem sido feita com microrganismos nesse ecossistema, tornando imperativa a exploração de novos microrganismos que possam ser utilizados na preservação e obtenção de grandes potenciais biotecnológicos para Estado de São Paulo.

Portanto o presente projeto teve como objetivo contribuir para o levantamento da diversidade e identificação de microrganismos diazotróficos (fixadores biológicos de nitrogênio atmosférico) endofíticos de mangue vermelho (*Rhizophora mangle*) presentes em áreas do manguezal da Ilha do Cardoso (Cananéia – SP), como também possíveis estudos com o potencial biotecnológico destes microrganismos.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados pôde-se concluir que:

- A partir do processo de isolamento foram obtidas 53 bactérias diazotróficas endofíticas de mangue vermelho (*Rhizophora mangle*), destas 31 bactérias obtiveram resultado positivo na identificação realizada pela análise do perfil dos ácidos graxos da membrana celular, as outras 22 foram analisadas pelo seqüenciamento do gene 16S rDNA .

- Os testes de fixação biológica de nitrogênio, atividade de redução de acetileno (ARA) e produção de ácido-3-indolacético (AIA), que foram realizados "*in vitro*" resultaram em excelentes dados, proporcionando bactérias de grande interesse em futuros estudos relacionados a sua utilização na promoção de crescimento em plantas e com alto potencial biotecnológico.

- As 22 bactérias não identificadas pela análise do perfil dos ácidos graxos da membrana celular, foram seqüenciadas para o gene 16SrDNA e seus dados apresentados, em sua maioria precisaram de mais estudo para a identificação em valor de espécies. Cinco destas não obtiveram similaridade quanto ao banco de dados, podendo, assim, apresentarem uma nova descoberta de espécie ou gênero.

- A caracterização morfológica através de microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica foi de extrema importância para o aprofundamento nos estudos com microrganismos do gênero *Vibrio*, até então nunca relatado agindo endofiticamente em mangue vermelho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALONGI, D. M. Bacterial productivity and microbial biomasses tropical mangrove sediments. **Microb. Ecol.**, v.15, p.59–79, 1988.

ALONGI D. M., CHRISTOFFERSEN P., TIRENDI F. The influence of forest type on microbial-nutrient relationships in tropical mangrove sediments. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 171, p. 201-223, 1993.

ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI Jr. W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Can. J. Microbiol.**, v.47, p.229-236, 2001.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI Jr. W. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.3, p. 57-94.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI Jr. W.; PEREIRA, J. O. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electron. J. Biotechnol.**, v.3, p.40-65, 2000.

AYUKAI, T. AND BURNS, K. Distribution of suspended sediments and chlorophyll in the Fly and Sepik River plumes. **EOS Trans. Am. Geophys**, 1998. Union 79:OS21C-5.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, R.S.; DOBEREINER, J. Recent advances in BFN with non legumes plants. **Soil Biol. Biochem.**, v.29, p.922-928, 1997.

BANDARANAYAKE, W. M. Traditional and medicinal uses of mangroves. **Mangroves Salt Marshes**, v.2, p.133-148, 1998.

BANDARANAYAKE, W. M. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. **Weed Biol. Manag.**, v.10, p. 421-452, 2002.

BENIZRI, E.; COURTADE, A.; PICARD, C.; GUCKERT, A. Role of maize root exudate in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M31. **Soil Biol. Biochem.**, v. 30, n. 10, p. 1481-1484, 1998.

CARCINICULTURA. Disponível em:
<<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./agua/salgada/index.html>>.
Acesso em: 12 abr. 2005.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant nitro-gen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.

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

COELHO-JR, C. **Manguezal, desenvolvimento estrutural da cobertura vegetal ao longo de gradientes de inundação – Cananéia, Estado de São Paulo, Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 108p., 1998.

COELHO-JR, C. **Ecologia de Manguezais: Zonação e dinâmica dos bosques de mangue em gradientes ambientais (Cananéia, São Paulo)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, São Paulo, 165p., 2003.

COSTACURTA, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytormones by plant-associated bacteria. **Crit. Ver. Microbiol.**, v. 21, p. 1-18, 1995.

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

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

DIEGUES, A.C.S. **Ecologia humana e planejamento em áreas costeiras**. 2ªEd. S.P. USP, Núcleo de Apoio à Pesquisa sobre populações humanas em áreas úmidas brasileiras, 225p. 2001.

DOBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganism and nitrogen-fixing sites. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION, 1., Washington, 1976. Proceedings. Washington: Washington State University, 1976. p. 518-538.

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

DOWNING, K. J.; THOMSON, J. A. Introduction of the *Serratia marcescens chiA* gene into an endophytic *Pseudomonas fluorescens* for biocontrol of phytopathogenic fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.363-369, 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. Embrapa Informática e Tecnologia. 2002. v.5. 130p.

FAO, **The world's mangroves 1980–2005**. A thematic study prepared in the framework of the global forest resources assessment 2005. ISSN 0258-6150. Rome, 2007.

F. W. HICKMAN-BRENNER, et al. *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* Isolated from a Stool Sample of One Patient. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, JULY 1984, p. 125-127.

FERNANDEZ, O.; CAPDEVILA, J. Z.; DALLA, G.; MELCHOR, G. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. **Fitoterapia** v. 73, p. 564-568, 2002.

FRANK, P.; RANJARD, L.; NAZARET, S.; GOUBIÉRE, F.; MONROZIER, L. J. Comparison of *nifH* gene pools in soil and soil microenvironments with contrasting properties. **Applied and Environmental Microbiology**. 2001. vol. 7. p. 2255-2262.

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

HALBLEIB, C. M.; LUDDEN, P. W. Regulation of biological nitrogen fixation. **American Society for Nutritional Sciences**, p.1081-1084, 2000.

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.

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

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

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

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M.; KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.1913-1923, 1994.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**. p.194-209, 2000.

KOBAYASHI, M.; SUZUKI, T.; FUJITA, T.; MASUDA, M.; SHIMIZU, S. Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in

plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. **Proc. Natl Acad Sci U.S.A.**, v. 92, p. 714-718, 1995.

KRISTENSEN E, JENSEN M. H., BANTA G. T., HANSEN K., HOLMER M., KING G. M. (1998) Transformation and transport of inorganic nitrogen in sediments of a southeast Asian mangrove forest. **Aquat. Microb. Ecol.** 15:165-175.

KUMAR, S., TAMURA, K., AND NEI, M. 2004, MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Brief Bioinform.** 5: 150-1663.

LEINHOS, V.; VACEK, O. Biosynthesis of auxins by phosphate solubilizing rhizobacteria from wheat (*Triticum estivum*) and rye (*Secale cereale*). **Microbiological Research**, v. 149, p. 31-35, 1994.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.21, p.583-606, 2002.

McCULLY, M. E. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.983-990, 2001.

MCINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. Populations dynamics of endophytic bacteria in field-growth sweet corn and cotton. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 895-901, 1995.

N. RAMESHKUMAR e S. NAIR. Isolation and molecular characterization of genetically diverse antagonistic, diazotrophic red-pigmented vibrios from different mangrove rhizospheres. **Microbiol. Ecol.** 67 (2009) 455–467.

NATIONAL GEOGRAPHIC MAGAZINE , 2007 ,
<http://ngm.nationalgeographic.com/2007/02/mangroves/warne-text>.

NETO, P.A.S.P.; AZEVEDO, J.L.; CAETANO, L.C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletim latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromática**, v.3, p.69-72, 2004.

NEVES, M. C. P.; RUMJANECK, N. G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488p.

O'SHEA A. YVONNE, ET AL. The *Vibrio* seventh pandemic island-II is a 26.9kb genomic island present in *Vibrio cholerae* *El Tor* and *O139* serogroup isolates that shows homology to a 43.4kb genomic island in *V. vulnificus*. **Microbiology** (2004), 150, 4053–4063.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (Ed.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer Verlag, 1991. p. 179-97.

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

RADERMAKER, J. L. W.; HOSTE, B.; LOUWS, F. J.; KERTERPS, K.; SWINGS, J.; VAUTERRIN, L.; VAUTERIN, P.; DE BRUJIN, F. J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprint with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v 50, p. 665-677, 2000.

RAVIKUMAR S. et al. Nitrogen-fixing azotobacters from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers. **Journal of experimental marine biology and ecology**; 312 , 5-17 , 2004.

REINHOLD-HUREK, B; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Elsevier Sciences**. 1998.

RIVERA-MONROY, V. H., TWILLEY R. R. (1996) The relative role of dinitrification and immobilization in the fate of inorganic nitrogen in mangrove sediments (Términos Lagoon, México). **Limnol. Oceanogr.** 41:284-296.

RIBEIRO NETO, F. B. & OLIVEIRA, M. F. de (1989) **Estratégias de sobrevivência de comunidades litorâneas em regiões ecologicamente degradadas: o caso da Baixada Santista**, São Paulo, PPCAUB/F.FORD/IUCN/IOUSP, Série Estudos de Caso, n. 1.

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

Rösch, R.; Mergel, A.; Bothe, H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 3818-3829, 2002.

SENGUPTA A., CHAUDHURI S. Ecology of heterotrophic dinitrogen fixation in the rhizosphere of mangrove plant community at the Ganges river estuary in India. **Oecologia** 87:560-564, 1991.

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

SILVA, R.G. *Equações para estimativas da carga térmica radiante através do globo de Vernon*. In: WORKSHOP DE BIOCLIMATOLOGIA ANIMAL, 2, 1989, Jaboticabal. *Proceedings...* Jaboticabal.[s.n] 1989

SOBRAL, J. K. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003. 174f. Tese (Doutorado) - Escola

Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

SPALDING, M., BLASCO F., FIELD C. **World Mangrove Atlas**. The International Society for Mangrove Ecosystems, Okinawa, Japan, 178pp, 1997.

STOLTZFUS, J. R.; SO, R.; MALARVITHI, P. P.; LADHA, J. K.; BRUIJN, F. J. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil**, v.194, p.25-36, 1997.

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

STURZ, A.V; MATHESON, B.G. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. **Plant and Soil**, v.184, p.265-271, 1996.

TOMLINSON, P.B. 1986. **The botany of mangroves**. Cambridge, UK, Cambridge University Press.

THOMASHOW, L. S.; REEVES, S.; THOMASHOW, M. F. Crown gall oncogenesis: evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indolacetic acid. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 81, p. 5071-5075, 1984.

THOMPSON L. FABIANO, TETSUYA LIDA AND JEAN SWINGS; Biodiversity of Vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Sept. 2004, p. 403–431, vol. 68, nº 3.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **J Bacteriol**, v. 177, p. 1414-1417, 1995.

VANCE, C. P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining. Renewable resources. **Plant Physiology**. 2001. v. 127. p. 390-397.

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

XU, X.-R., et al., Metabolism and biochemical pathway of n-butyl benzyl phthalate by *Pseudomonas fluorescens* B-1 isolated from a mangrove sediment. **Ecotoxicology and Environmental Safety** (2007), doi:10.1016/j.ecoenv.2006.11.012.

ZEHR, J. P.; MCREYNOLDS, L. A. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 2522-2526, 1989.