

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
MESTRADO EM MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

IVANA BOGADO MARTINEZ

**BIODIVERSIDADE DE BACTÉRIAS LIGNOCELULOLÍTICAS DA
MATA ATLÂNTICA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**NITERÓI
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

IVANA BOGADO MARTINEZ

**BIODIVERSIDADE DE BACTÉRIAS LIGNOCELULOLÍTICAS DA
MATA ATLÂNTICA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação em Microbiologia e
Parasitologia Aplicadas, como requisito
parcial para a obtenção do Grau de Mestre.

Orientadores:

Prof. Dr. FABIANO LOPES THOMPSON
Prof^ª. Dra. SILVIA MARIA BAETA CAVALCANTI

**Niterói
2009**

IVANA BOGADO MARTINEZ

**BIODIVERSIDADE DE BACTÉRIAS LIGNOCELULOLÍTICAS DA
MATA ATLÂNTICA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação em Microbiologia e
Parasitologia Aplicadas, como requisito
parcial para a obtenção do Grau de Mestre.

Aprovada em 10 de fevereiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aloysio de Mello F. Cerqueira (UFF)

Prof^a Dra. Ana Carolina Paulo Vicente (Fiocruz)

Prof^a Dra. Leda C. S. Mendonça Hagler (UFRJ)

**Niterói
2009**

M385 Martinez, Ivana Bogado
Biodiversidade de bactérias lignocelulolíticas da Mata
Atlântica do Estado do Rio de Janeiro / Ivana Bogado Martinez.
- Niterói: [s.n.], 2009.
64 f.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
2008.

1. Microbiologia Ambiental. 2. Biodiversidade. 3. Mata
Atlântica. 4. Bacteriologia. 5. Classificação I. Título.

CDD 576

Às pessoas mais importantes de minha vida,

*Aos meus queridos avós, Idália (in memoriam) e Mário,
por todo carinho e hospitalidade.*

*Aos meus pais, Maria Aparecida e Anselmo,
pelo amor, estímulo e confiança.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é a razão maior de tudo,

À minha querida avó Idália, que tenho certeza que continua vibrando com as minhas conquistas,

Aos meus parceiros incondicionais, que compartilharam os momentos mais importantes comigo, meu avô e minha mãe, por todo amor, apoio e carinho,

Ao meu pai, por acreditar e torcer por mim, e aos meus queridos irmãos, Renan e Luiza,

Ao meu querido Alex, que foi uma grande conquista atrelada ao projeto,

Ao meu orientador, Fabiano Thompson, uma pessoa altamente determinada, de visão e de sucesso, que me acrescentou inúmeros valores profissionais,

À orientadora Silvia Cavalcanti, que acreditou no meu talento e abriu os meus caminhos, permitindo o desenvolvimento deste projeto,

Ao professor Jefferson Carvalho, que mais que um coordenador foi um grande amigo, sempre solícito, apresentando boas soluções diante dos problemas,

Aos demais professores do programa de mestrado em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas, por acreditarem e se dedicarem à 1ª turma de alunos,

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- Cnpq, pela concessão da bolsa de mestrado

A todo laboratório de Genética Molecular Bacteriana (LGMB), representado na figura da professora Ana Coelho, pelo acolhimento e suporte,

Aos amigos maravilhosos que conquistei no LGMB que compartilharam comigo ricas experiências profissionais e pessoais, que marcarão para sempre,

Ao grupo de Biodiversidade e Taxonomia Microbianas e aos seus “agregados”, pelos momentos ímpares proporcionados e pelo prazeroso ambiente de trabalho que sempre serão lembrados com muito saudosismo (Nelson Alves, Oswaldo Maia, Eidy dos Santos, Anderson Lemos, Ana Paula Moreira, Bruno Sérgio Silva, Thiago Bruce Cristiane Thompson, Janaina Leme, Rodrigo Reis, Mayla Stelman, Gilda do Amaral, Felipe Gouveia, Thiago Dantas, Itamar e tantos outros não menos especiais),

À equipe do PARNASO, pela concessão da licença e pela receptividade,

Muito Obrigado!

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo caracterizar a biodiversidade de bactérias lignocelulolíticas cultiváveis da Mata Atlântica. Oito tipos de solo contendo características edáficas distintas foram obtidos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), uma Unidade de Conservação da Mata Atlântica localizada no estado do Rio de Janeiro, Brasil. As amostras de solo foram caracterizadas bioquimicamente e utilizadas para a quantificação e isolamento de bactérias presuntivamente caracterizadas como celulolíticas, lignolíticas e actinomicetos, com base no crescimento em meios de cultivo complexos, enriquecidos com carboximetil celulose, lignina, e em meio seletivo para isolamento de actinomicetos, respectivamente. Os isolados foram identificados por meio de seqüenciamento parcial do rRNA 16S e avaliadas quanto à capacidade de metabolismo da carboximetil celulose e lignina, com base no crescimento em meios de cultivo à base de sais minerais suplementados com carboximetil celulose ou lignina. O resultado obtido da análise quantitativa de todos os grupos funcionais analisados se distribuiu nas faixas de 10^6 a 10^8 UFC/g. Uma coleção de cultura foi estabelecida contendo 77 morfotipos distintos agrupados em 24 gêneros bacterianos, distribuídos nos filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria*. Dentre eles, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus* e *Paenibacillus* foram verificados com maior frequência na coleção e demonstraram uma ampla distribuição geográfica no PARNASO. O metabolismo da lignocelulose esteve amplamente distribuído em bactérias do filo *Proteobacteria*. O metabolismo da carboximetil celulose foi observado na maioria dos isolados testados (90%), embora a degradação da lignina tenha se mostrado mais restrita, sendo observada em cerca de 20% dos isolados da coleção. Em alguns casos, foram obtidas seqüências de rRNA 16S com níveis de similaridade muito próximos dos 97% utilizado para definir espécies bacterianas diferentes, havendo possibilidade de descrição de espécies novas. O PARNASO demonstrou ser uma área de grande ocorrência de diversidade de bactérias lignocelulolíticas, contendo muitos gêneros bacterianos com alto potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Microbiologia Ambiental. Biodiversidade. Mata Atlântica. Bacteriologia. Classificação.

ABSTRACT

The aim of this work was to describe the lignocellulolytic biodiversity of cultivated bacteria from Atlantic Forest. Eight kinds of soils with different edaphic characteristics were obtained from National Park of Serra dos Órgãos (PARNASO), an Atlantic Forest Conservation Unit localized in Rio de Janeiro state, Brazil. The soil samples were been biochemistry characterized and employed for quantification and isolation of bacteria presumptively characterized as cellulolytic, lignolitic and actinomycete, based on growth in complex media, enriched with carboxymethyl-cellulose or lignin, and Àgar for isolation of actinomycete, respectively. Isolates were identified by partial sequencing of 16S rRNA and analyzed for metabolism of carboxymethyl-cellulose and lignin, based on growth in mineral salts media supplemented with carboxymethyl-cellulose and lignin. The result of quantitative analyzes from all functional groups analyzed was distributed in the range of 10^6 a 10^8 UFC/g. A culture collection were been established containing 77 distinct morfotypes, grouped in 24 bacterial genera, belonging to the *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Actinobacteria* phyla. Among them, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus* and *Paenibacillus* were obtained more frequently in the collection and demonstrated a wide geographic distribution in PARNASO. Lignocellulolytic metabolism was distributed in bacteria of *Proteobacteria* phyla. The carboxymethyl-cellulose metabolism were observed in almost all isolates tested (90%), although the lignin degradation were been showed more restrict, been observed in 20% of the collection isolates. In some cases, 16S rRNA sequences were obtained with similarity levels very close to the cutt-of of 97% used to define different bacterial species, occurring the possibility of describing new species. PARNASO demonstrated to be an area of high occurrence of lignocelullolytic bacterial diversity, and were found a lot of genera with high biotechnological potential of use.

Keywords: Environmental Microbiology. Biodiversity. Atlantic Forest. Bacteriology. Classification.

SUMÁRIO

Resumo.....	07
Abstract.....	08
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Mata Atlântica e PARNASO.....	13
1.2 Biodiversidade microbiana.....	14
1.3 O solo e as bactérias lignocelulolíticas.....	16
1.4 Taxonomia aplicada à identificação de bactérias.....	19
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Coleta e processamento do material.....	24
3.2 Contagem, isolamento e manutenção das amostras.....	25
3.3 Extração de DNA.....	26
3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	26
3.5 Purificação e Quantificação do Produto de PCR.....	27
3.6 Sequenciamento de DNA.....	28
3.7 Reconstrução filogenética.....	29
3.8 Triagem das atividades celulolítica (endoglucanase) e lignolítica.....	30
4 RESULTADOS.....	32
4.1 Análises Químicas dos solos.....	32
4.2 Quantificação de bactérias totais e de morfotipos bacterianos.....	33
4.3 Identificação das bactérias lignocelulolíticas.....	33
4.4 Caracterização das atividades celulolítica (endoglucanase) e lignolítica.....	39
5 DISCUSSÃO.....	44
5.1 Densidade Populacional de Bactérias Lignocelulolíticas.....	44
5.2 Grupos Taxonômicos	44
5.3 Métodos dependentes e independentes de cultivo.....	48
5.4 Lignocelulose.....	50

6 CONCLUSÕES.....	52
7 PERSPECTIVAS.....	53
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento do gene rRNA 16S.....	30
Tabela 2: Parâmetros químicos dos solos analisados.....	32
Tabela 3: Quantificação de bactérias totais (UFC/g) e de morfotipos bacterianos em solos da Mata Atlântica de acordo com o grupo funcional e o ponto de coleta.....	33
Tabela 4: Lista dos isolados obtidos dos diferentes solos contendo as alocações filogenéticas baseadas no sequenciamento do rRNA 16S e as atividades de celulasas (endoglucanase) e ligninase.....	40- 42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da celulose.....	17
Figura 2: Mapa contendo a localização dos pontos de coleta.....	24
Figura 3: Meios preparados com extratos de solo enriquecidos com celulose e lignina.....	25
Figura 4a ,b e c: Árvores de Neighbor Joining representativas dos filos <i>Actinobacteria</i> (4a) <i>Firmicutes</i> (4b) e <i>Proteobacteria</i> (4c), baseadas em sequências parciais do gene rRNA 16S de linhagens tipo e de isolados pertencentes aos grupos funcionais de bactérias celulolíticas, lignolíticas e actinomicetos.....	36 - 39
Figura 5: Placas contendo alguns halos de degradação da celulose.....	43

1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um bioma extremamente rico em biodiversidade apesar da grande devastação que vem ocorrendo nas últimas décadas. Este bioma é um dos cinco *hotspots* de conservação mundial. São raríssimos os estudos envolvendo a caracterização taxonômica de bactérias da Mata Atlântica. Bactérias do grupo funcional das lignocelulolíticas são fundamentais para a saúde do solo, e conseqüentemente, diretamente responsáveis pela biodiversidade característica destes ambientes. Além disso, são economicamente bastante atrativas, pois as enzimas produzidas por estes micro-organismos são aplicáveis na bioindústria, como por exemplo, na produção de bioetanol. Microbiologistas ambientais ultimamente têm demonstrado um grande interesse na caracterização microbiana de ecossistemas terrestres em função da grande variedade genética e de atividades metabólicas associadas aos micro-organismos com aplicações biotecnológicas.

1.1 Mata Atlântica e PARNASO

A Mata Atlântica é uma formação vegetal brasileira que se estende do Rio Grande do Sul ao Piauí e que abriga diferentes formas de relevo, clima e paisagem. Ela se distribui em faixas litorâneas, florestas de baixada, matas interioranas e campos de altitude, compreendendo um conjunto de ecossistemas com processos ecológicos interligados, como restingas e manguezais. Estes são conectados através do trânsito de animais, do fluxo de genes da fauna e flora e pela presença de áreas de transição ecológica, onde diferentes ambientes se encontram e se transformam gradativamente. Além disso, o bioma Mata Atlântica abriga sete das nove maiores bacias hidrográficas brasileiras (Moreira, 1999).

Depois da Floresta Amazônica, a Mata Atlântica representa o maior bloco de biodiversidade do país e consiste em uma das maiores e mais importantes florestas tropicais do continente Sul-Americano (<http://www.rbma.org.br/anuario>). Apesar disso seu território original, que apresentava mais de 1.300.000 km², sofreu um intenso processo de redução e hoje apresenta apenas 8% desta extensão, devido à devastação

maciça provocada por práticas agrícolas, como cultivo da cana-de-açúcar e do café, pela exploração madeireira e pelo intenso crescimento urbano. A Mata Atlântica é hoje considerada uma das florestas tropicais mais ameaçadas de extinção e sua conservação em nível global tornou-se prioritária. De acordo com Myers (2000), ela se encontra entre os cinco primeiros colocados mundiais na lista de biomas ameaçados de extinção.

Uma parte considerável da Mata Atlântica está conservada sob a forma de parques nacionais e estaduais. O Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO) é uma região de preservação da Mata Atlântica que foi criada em 1939 para proteger a biodiversidade de parte do trecho da Serra do Mar na região serrana do Rio de Janeiro, envolvendo os municípios de Teresópolis, Petrópolis, Magé e Guapimirim. O PARNASO apresenta florestas de encosta e campos de altitude que variam de 200 a 2.263 m de altitude. Amplas variações de altitude geram ambientes únicos de grande diversidade biológica. A Serra dos Órgãos está inserida no domínio morfo-climático Tropical Atlântico, com clima tropical super úmido e média anual de temperatura variando de 13° a 23° C. No verão, há uma concentração de chuvas, com grande variação pluviométrica (1.700 a 3.600 mm), já o período de seca é característico do inverno (<http://www.ibama.gov.br>).

Muitos estudos vêm sendo realizados no PARNASO em diversas áreas da biologia (Papi, Loretto & Vieira, 2008; Oliveira et al., 2008; Cunha, Grelle, & Boubli, 2007; Mallet-Rodrigues, 2007; Monteiro et al., 2007). Entretanto, a literatura conta com raríssimos trabalhos abordando a biodiversidade de micro-organismos nesta área do estado fluminense. Alguns dos poucos trabalhos realizados com amostras coletadas da Mata Atlântica com enfoque microbiológico, consideram a qualidade microbiológica da água (Terra & Araújo, 2007), a biodiversidade de bactérias não cultiváveis (Lambais et al., 2006) e o isolamento de grupos bacterianos específicos (Semedo et al., 2004; Souchie et al., 2006; Lima-Bittencourt et al., 2007), justificando a carência de projetos nesta área.

1.2 Biodiversidade microbiana

Os micro-organismos exercem papéis fundamentais considerando aspectos ecológicos e econômicos. Do ponto de vista ecológico, participam de importantes ciclos biogeoquímicos (carbono, nitrogênio e enxofre, por exemplo) (Paul & Clark, 1996), na transformação de metais como ferro e mercúrio (Handelsman, 2004), atuam aumentando a produtividade de plantas, protegendo-as contra o ataque de outros micro-organismos e fornecendo vitaminas e outros nutrientes importantes para seu metabolismo (Heijden, Bardgett & Straalen, 2008). Além das marcantes vantagens ecológicas, o avanço no conhecimento da biodiversidade microbiana apresenta um grande interesse econômico. De maneira geral, estes estudos fornecem dados altamente interessantes para indústrias, permitindo avanços biotecnológicos principalmente nas áreas de biorremediação, conversão energética, biocatálise e síntese de produtos naturais. As vantagens podem ser observadas em estudos envolvendo micro-organismos lignocelulolíticos, por exemplo, que passaram a ser altamente atrativos diante da crise no setor de energia causada pelo aumento da demanda do petróleo (Kim et al., 2008; Wulff, Carrer & Pascholati, 2006). Por outro lado, uma parcela significativa da microbiota cultivada do solo da Mata Atlântica permanece desconhecida. Portanto, é especialmente importante conhecer a identidade dos micro-organismos que habitam o solo da Mata Atlântica, tendo possíveis papéis ecológicos neste bioma.

Historicamente, a caracterização da biodiversidade microbiana é realizada através da taxonomia. A taxonomia se baseia em metodologias dependentes de cultivo. A etapa inicial de um estudo taxonômico envolve o isolamento e a manutenção em laboratório de micro-organismos que ocorrem naturalmente no meio ambiente, permitindo a construção de uma coleção microbiana. É uma metodologia altamente atrativa, pois permite a determinação de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas da coleção microbiana, além de possibilitar a utilização de micro-organismos para fins biotecnológicos. Estes aspectos permitem a pesquisa e a bioprospecção rápida e pontual de diversos processos com potencial de aplicação biotecnológica a partir de culturas puras (Yeon, Jeong & Park, 2005).

Já na abordagem independente de cultivo, o DNA total de uma determinada amostra, isto é, o metagenoma, é obtido e analisado diretamente sem a necessidade de isolamento e cultivo microbiano. Esta metodologia baseia-se na clonagem de moléculas de DNA coletadas diretamente do ambiente e no seqüenciamento de marcadores, mais

comumente o rRNA 16S (Pace et al., 1985; Pace et al., 1986). Os resultados obtidos através desta metodologia são complementares aos obtidos por meio das metodologias dependentes de cultivo, pois recuperam uma grande parcela de micro-organismos que não é cultivada em função das limitações das metodologias de cultivo. Como as condições de cultivo são diferentes das condições do meio ambiente, há sempre uma parcela da microbiota que não cresce nos meios empregados em estudos taxonômicos. Utilizando-se uma abordagem independente de cultivo, é possível caracterizar um percentual muito maior do que aquele que é normalmente obtido através do cultivo. Alguns estudos apontam que apenas 1% da população microbiana é cultivável (Torsvik & Ovreas, 2002). Uma das desvantagens associadas ao uso desta abordagem é a ausência da célula microbiana isolada em laboratório, que dificulta enormemente a identificação e expressão de genes com aplicação biotecnológica, uma vez que o DNA obtido diretamente do ambiente apresenta um alto grau de contaminação com compostos polifenólicos. Mesmo a partir de DNA puro, a clonagem de insertos grandes e a expressão de proteínas em sistemas exógenos ainda é um grande desafio (Streit & Schmitz, 2004). Um outro aspecto negativo decorrente do uso da metodologia independente de cultivo está relacionada à identificação dos micro-organismos, que dessa forma fica limitada à análise de sequências de rRNA 16S obtidas de clones ou de bandas de géis de DGGE, prejudicando a realização de estudos complementares necessários para uma caracterização taxonômica completa dos micro-organismos em questão.

1.3 O solo e as bactérias lignocelulolíticas

O solo é a camada mais superficial da crosta e é composto por sais minerais dissolvidos na água intersticial, seres vivos e rochas em decomposição. A organização estrutural do solo é bastante heterogênea, essencialmente formada por agregados resultantes da associação da matéria orgânica e mineral (Tisdall & Oades, 1982). Estes agregados geram micro-habitats, contendo variações de pH e de parâmetros físicos, bem como diferenças de temperatura, na concentração de água e de nutrientes (Ladd et al., 1996). Até mesmo entre micro-habitats espacialmente muito relacionados, ocorre variação na composição microbiana (Madigan, Martinko & Parker, 1996). Além dos fatores físico-químicos mencionados, a comunidade macrobiótica do solo também apresenta grande

influência na composição das comunidades microbianas, observando-se uma grande variabilidade de acordo com as espécies de plantas presentes no ecossistema (Wardle et al., 2004; Bardgett et al., 1999).

Os micro-organismos são elementos-chave para a formação dos solos, e são predominantemente encontrados nas regiões mais próximas à superfície, onde também se observa uma maior biodiversidade (Zhou et al., 2008). O biopolímero mais rico do planeta é a lignocelulose, que também se acumula principalmente nesta região mais próxima à superfície, conhecida como horizonte A, sendo proveniente da decomposição de restos de plantas e raízes (Braidly & Weil, 1996). A lignocelulose serve como proteção para as células de plantas verdes, fortalecendo as diferentes estruturas que a compõe. Ela apresenta em sua composição diferentes concentrações de celulose, hemicelulose e lignina, e em termos percentuais, inclui aproximadamente, 40-60% de celulose, 20-40% de hemicelulose e 10-25% de lignina (Hamelinck, Hooijdonk & Faaij, 2005). Os carboidratos estão fortemente ligados à lignina principalmente por pontes de hidrogênio e ligações covalentes. A lignina compreende uma macromolécula (> 10 KDa) complexa, variável, altamente hidrofóbica e aromática que é hidrolizada pela ação de enzimas como lignina peroxidases, lacases, e peroxidases dependentes de manganês. Ela consiste em um polímero aromático tridimensional formado por unidades de *p* hidroxifenilpropanoide conectadas por ligações do tipo C-C ou C-O-C (Lee, 1997).

A celulose representa 1/3 da matéria orgânica vegetal e apresenta uma estrutura altamente cristalina, representando uma grande fonte energética para micro-organismos (Norkrans, 1967; Cao & Tan, 2002). A estrutura deste polímero é extremamente rígida, sendo formada por unidades residuais de β -D-glucose, que interagem entre si através de ligações β -1,4 (Figura 1), mantendo uma estrutura linear e plana (Aristidou & Penttilä, 2000). A degradação completa da celulose requer um complexo formado principalmente por três classes enzimáticas, que devem atuar de maneira sinérgica. Este complexo é composto por endoglucanases, que hidrolizam randomicamente a fibra de celulose nas ligações β -1,4 internas reduzindo o tamanho do polímero; exoglucanases que hidrolizam a celulose a partir dos terminais não-redutores, liberando unidades de celobiose; e β glicosidases que clivam os oligossacarídeos ou as celbioses livres, gerando glicose (Han, Yoo & Kang, 1995; Lynd et al., 2002). O papel da celulose em células vegetais é exclusivamente estrutural. A alta força de tensão da celulose permite

às células vegetais suportar a pressão osmótica e é responsável pela resistência da planta ao estresse mecânico (Béguin & Aubert, 1994).

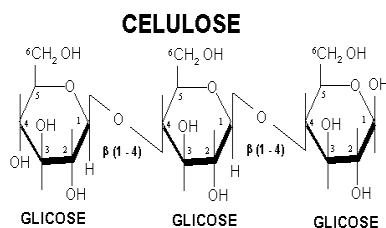


Figura 1. Estrutura química da celulose.

A lignina apresenta uma alta rigidez associada que torna sua estrutura de difícil degradação. No geral, a capacidade de degradação da lignina está mais associada aos fungos, que se apresentam como potentes decompositores desta substância. Este é um processo estritamente aeróbico (Boer et al., 2005). A decomposição da celulose, por outro lado, pode ocorrer tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas. Bactérias anaeróbicas desenvolveram um sistema altamente sofisticado e complexo para a degradação deste polímero e apresentam todas as enzimas associadas à degradação da celulose confinadas em uma estrutura especializada conhecida como celulosoma (Bayer et al., 1998). Entretanto, entre fungos e bactérias aeróbicas, esse sistema é mais simples, envolvendo a secreção destas enzimas para o meio extracelular. A degradação bacteriana aeróbica da celulose tanto pode ser realizada por bactérias filamentosas (ex: *Streptomyces* e *Micromonospora*), quanto por bactérias não filamentosas (ex: *Bacillus*, *Cellulomonas* e *Ruminococcus*). Entretanto, a habilidade de degradar celulose aerobicamente é muito mais difundida entre fungos, que representam os principais decompositores desta matéria orgânica no solo. O tipo de crescimento em forma de hifa, apresentado por fungos e actinomicetos, representa uma estratégia que favorecer a degradação da celulose, pois permite que as hifas penetrem na estrutura cristalina da celulose e secretem suas enzimas, permitindo a degradação deste composto. Apesar de bactérias não filamentosas também apresentarem esta atividade, as informações disponíveis para este grupo são bastante limitadas (Boer et al., 2005).

Os micro-organismos lignocelulolíticos participam de uma relação de sintotrofismo, fenômeno muito natural dentro de comunidades microbianas (Bull & Slater, 1982),

caracterizado pela cooperação de dois micro-organismos para a degradação de um composto (Madigan, Martinko & Parker, 1996). A hidrólise de polímeros complexos de celulose, por exemplo, permite a disponibilização de glucose para o estabelecimento de outros organismos incapazes de degradá-la. Dessa maneira, as bactérias lignocelulolíticas dirigem o fluxo de energia no solo e permitem o estabelecimento da biodiversidade nesses ecossistemas.

Além da conhecida importância das bactérias celulolíticas para o ciclo do carbono e para a saúde dos solos, enzimas produzidas por estes micro-organismos são bastante exploradas economicamente em processos biotecnológicos, em especial pela indústria de energia. Até o momento, vários laboratórios estão empenhados na construção de micro-organismos alterados geneticamente e na obtenção de enzimas para otimizar a degradação de lignocelulose e convertê-la em combustível (Schubert, 2006; Service, 2007). Micro-organismos capazes de produzir enzimas com aplicação na degradação de resíduos agrícolas, como a lignocelulose presente no bagaço da cana-de-açúcar, por exemplo, podem reduzir significativamente os custos associados à produção do combustível, e apresentam grande interesse econômico mundial. A despolimerização da celulose representa a etapa que gera o maior rendimento energético para a fermentação. Entretanto, este polímero encontra-se embebido numa matriz de lignina (10-25%), que apresenta uma estrutura química bastante complexa, incluindo anéis fenólicos (Lee, 1997). O emprego de micro-organismos (ou de enzimas), capazes de degradar simultaneamente estes dois compostos de maneira eficiente é essencial para um bom aproveitamento da energia derivada da biomassa lignocelulolítica. A utilização eficiente da celulose praticamente duplicaria a produção de etanol do país sem a necessidade de expansão da área de plantio.

1.4 Taxonomia aplicada à identificação de bactérias

A taxonomia é a ciência de classificação, identificação e nomenclatura dos seres vivos, e idealmente deve refletir as características evolutivas e filogenéticas das espécies. A classificação tem a finalidade de alocar os organismos em grupos afins, de acordo com características bioquímicas, fisiológicas, genéticas e morfológicas. Já a nomenclatura atribui a cada grupo individual um binômio de acordo com regras existentes, e a

identificação, consiste no uso de metodologias altamente discriminatórias previamente padronizadas e estudadas para o diagnóstico e a identificação dos grupos em questão. A identificação deve ser rápida, reprodutível e discriminatória (Brenner, Staley & Krieg, 2005).

A unidade básica da taxonomia é a espécie. Apesar de não existir um consenso na comunidade científica a respeito do conceito de espécie, a definição de espécie baseada na similaridade fenotípica e genotípica é amplamente aceita e aplicada. Linhagens da mesma espécie têm > que 70% de similaridade em ensaios de hibridização DNA –DNA, > 97% de similaridade em sequências de rRNA 16S e fenótipos parecidos.

Até o final de década de 1950, táxons bacterianos eram definidos com base em características chaves, que eram utilizadas para a classificação de grupos taxonômicos com relevância médica (principais patógenos bacterianos) e industrial (bactérias contaminantes). Este sistema de classificação gerava grupos heterogêneos de gêneros mal definidos e impossibilitava a classificação de micro-organismos desconhecidos (Priest & Austin, 1993). Uma série de conflitos marcou esta fase da taxonomia, que culminou com a reclassificação (Bergey, Bunchanan & Gibbons, 1974) ou remoção da lista dos nomes válidos (Skerman, McGowan & Sneath, 1980), de 90 % das espécies descritas na 7ª Edição do Bergey's Manual (Bergey & Breed, 1957).

Na década de 60, sistemas de classificação baseados em algoritmos e computadores começaram a ser implementados, marcando o surgimento da taxonomia numérica ou fenética, que foi introduzida por Sneath e Sokal (1973). Este sistema permite a comparação de grandes quantidades de características fenotípicas para um grande número de espécies. As matrizes de similaridade geradas mostram o grau de similaridade entre as espécies, e os dendogramas demonstram a consistência fenotípica de grupos particulares de cepas (Vandamme et al., 1996). Apesar de a taxonomia numérica representar uma metodologia altamente abrangente, ela não está fundamentada em aspectos evolutivos. Além disso, ocorre grande variação entre laboratórios considerando os métodos empregados, e pesos iguais são atribuídos a determinados aspectos que apresentam impactos diferentes na complexidade genética.

A descoberta da informação genética contida no DNA criou uma nova dimensão para a identificação de micro-organismos. Diante das limitações apontadas para a classificação dos micro-organismos, na década de 70 foi estabelecida a taxonomia polifásica, que propunha o emprego de caracteres genéticos, fenotípicos e quimiotaxonômicos, para a classificação dos micro-organismos (Colwell, 1970). A definição de espécie em procariontes com base em ensaios de hibridização DNA –DNA foi implementada por Wayne e colaboradores (1987), estabelecendo um novo paradigma na taxonomia que perdura até hoje (Vandamme et al., 1996; Gevers et al., 2005). Um aspecto prático importante é que as linhagens da mesma espécie devem diferir consideravelmente de linhagens de outras espécies por meio de características fenotípicas e quimiotaxonômicas (Brenner, Staley & Krieg, 2005). Esta definição considera o princípio multidisciplinar proposto pela taxonomia polifásica, pois envolve a caracterização do micro-organismo sob diferentes aspectos, de moleculares a ecológicos. Sendo assim, micro-organismos desconhecidos depois de isolados são classificados com base em uma série de aspectos distintos, e uma vez classificados, um esquema de identificação rápido e prático é estabelecido para o novo táxon.

A hibridização DNA–DNA é a metodologia considerada padrão de referência para a definição de espécie, e foi estabelecida com base em análises comparativas, que mostraram um alto grau de correlação entre esta metodologia e uma série de outros parâmetros que eram usualmente empregados (quimiotaxonômicos, genômicos, sorológicos e numéricos fenotípicos) (Colwell, 1970). Apesar disso, muitas dificuldades estão associadas à implementação e execução desta técnica nos laboratórios, impedindo que esta metodologia seja utilizada como rotina para a identificação bacteriológica (Konstantinidis, Ramette & Tiedje, 2006; Brenner, Staley & Krieg, 2005).

Com o desenvolvimento de protocolos extremamente rápidos de sequenciamento de rRNA 16S e o aumento substancial de bancos de dados, tais como o RDP (Ribosomal Database Project) uma grande discussão se iniciou considerando seu uso em substituição aos ensaios de hibridização DNA-DNA. Stackebrandt & Goebel (1994) realizaram um trabalho avaliando a relação entre estas duas metodologias, e os resultados mostraram a existência de correlação, apesar de não ser linear. Quando a similaridade entre as sequências de rRNA 16S era baixa (<97%), indicando a ocorrência de espécies não relacionadas, a hibridização DNA-DNA gerava resultados congruentes.

A confirmação da existência de correlação entre estas metodologias, não foi suficiente para considerar o rRNA 16S como metodologia alternativa à hibridização DNA-DNA, pois demonstrou-se que a resolução filogenética associada à esta ferramenta muitas vezes é baixa, gerando sub-estimativas para espécies muito relacionadas. Espécies contendo rRNA 16S praticamente idênticos, apresentavam menos de 70% de similaridade nos ensaios de hibridização DNA-DNA. Este é o caso de muitas espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Burkholderia*, por exemplo (Palmisano et al., 2001; Payne et al., 2005). Aliado à baixa resolução do rRNA 16S existem outras desvantagens considerando o emprego desta ferramenta: (i) o número de cópias destes genes pode variar de uma espécie para outra, levando ao processo de conversão gênica (Frostegard et al., 1999; von Wintzingerode, Gobel & Stackebrandt, 1997) e (ii) dúvidas a respeito do grau de resistência que estes genes apresentariam a transferência lateral (Yap, Zhang & Wang, 1999).

Apesar de todas as críticas e desvantagens apontadas, o emprego do rRNA 16S revolucionou a taxonomia de procariontes. O rRNA 16S é o marcador filogenético disponível mais conservado e nenhum outro gene ou cluster de genes foi encontrado até o momento que pudesse ser empregado em substituição a ele. Este gene é universalmente distribuído, e esta característica torna-se bastante atrativa uma vez que existe a possibilidade de utilização de um único par de iniciadores capazes de amplificar o rRNA 16S de praticamente todas as bactérias (Fox, Pechman & Woese, 1977; Lane et al., 1985). Além disso, este gene apresenta um tamanho adequado para análise comparativa, com aproximadamente 1500 pares de bases, e atualmente dispõe-se de um robusto banco de dados de acesso livre na rede, o GenBank, contendo cerca de 400 000 sequências (McInerney, Cotton & Pisani, 2008).

Sem sombras de dúvidas, o sequenciamento do rRNA 16S revolucionou a taxonomia de procariontes nos últimos 30 anos (Fox, Pechman & Woese, 1977) e atualmente representa a metodologia mais utilizada para a identificação microbiana (Brenner, Staley & Krieg, 2005). Apesar do rRNA 16S não cobrir a mesma amplitude que os ensaios de hibridização DNA-DNA, esta ferramenta é extremamente útil, podendo ser utilizada em estudos de biodiversidade, permitindo que se obtenha um panorama dos principais micro-organismos presentes no ambiente analisado, e se avalie de maneira rápida e prática a real necessidade de realização de ensaios de reassociação de DNA

para a descrição das espécies novas, pois permite a definição dos vizinhos filogenéticos mais próximos, bem como a relação de similaridade existente entre eles. Além disso, esta ferramenta pode ser utilizada como componente de um sistema polifásico de classificação e empregada em conjunto com outras metodologias que apresentam alto poder discriminatório para a classificação dos micro-organismos (Stackebrandt & Goebel 1994).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Estudar a biodiversidade de bactérias lignocelulolíticas cultivadas, obtidas de diferentes tipos de solo da Mata Atlântica obtidos no PARNASO.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer uma coleção representativa de isolados microbianos lignocelulolíticos putativos da Mata Atlântica (PARNASO).
- Posicionar estes isolados bacterianos no espaço taxonômico, através de sequenciamento e análise filogenética do rRNA 16S.
- Testar as atividades celulolítica (endoglucanase) e lignolítica da coleção de isolados microbianos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e processamento do material

O PARNASO é uma região de preservação da Mata Atlântica que fica localizado no estado do Rio de Janeiro, entre 22° 52' e 22°54' S e 42°09' W. Em julho de 2007, 8 amostras de solo contendo ,edáficas distintas foram coletadas em pontos distribuídos ao longo da trilha da Travessia Petrópolis-Teresópolis localizada no PARNASO (figura 2). O solo foi obtido de uma profundidade máxima de 11 cm, peneirado (2 mm de diâmetro) para remoção de partículas grandes e acondicionado em sacos plásticos estéreis, sendo processado menos 12h após a coleta. As análises químicas e microbiológicas foram realizadas a partir das amostras de solo coletas do campo. Todas as análises químicas do solo foram realizadas pelo professor Eder Martins da Embrapa de Brasília, de acordo com padrões estabelecidos (Embrapa solos, 1999).

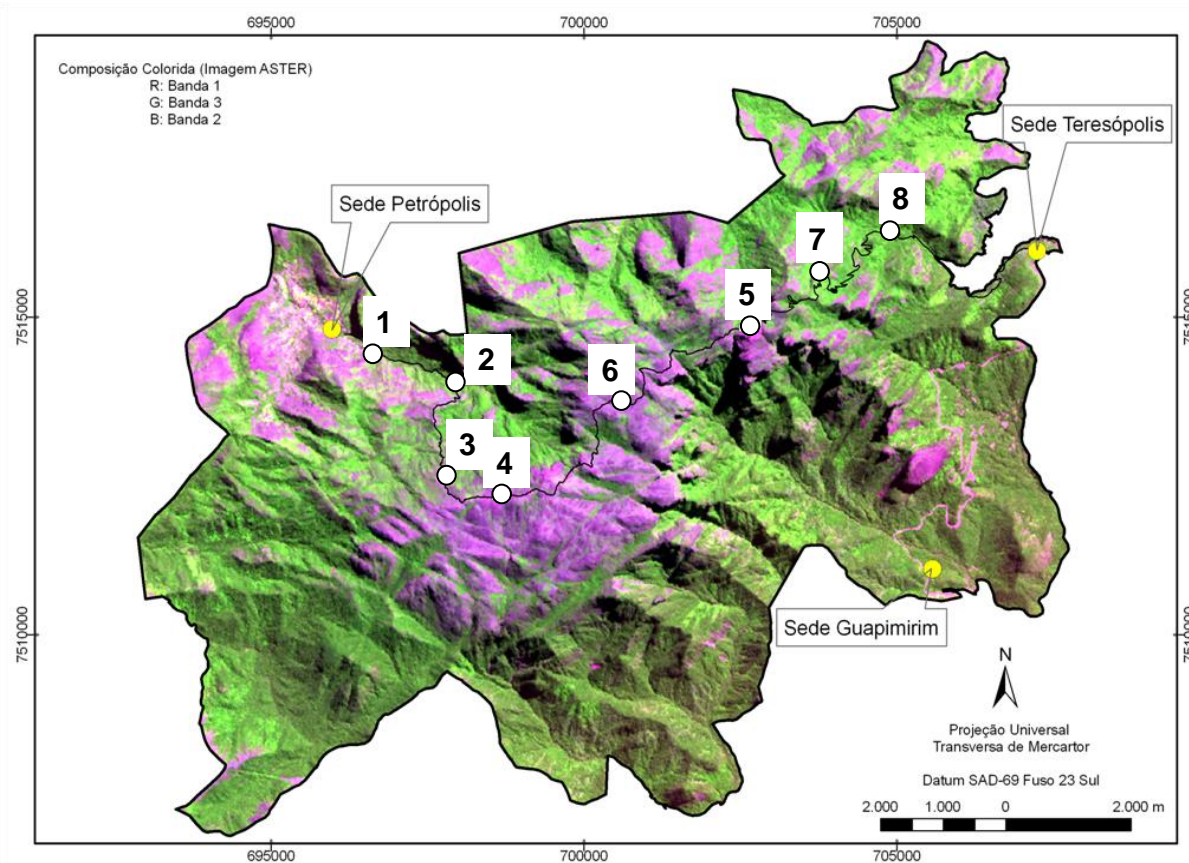


Figura 2: Mapa contendo a localização dos pontos de coleta. **1:** Bonfim, traço Amarelo; **2:** Bonfim, traço vermelho; **3:** Ajax; **4:** Torto Vale Alta Preta; **5:** Cavalinho; **6:** Campo Úmido; **7:** Abrigo 3; **8:** Floresta Parte Baixa.

3.2 Contagem, isolamento e manutenção das amostras

O isolamento presuntivo das bactérias celulolíticas e lignolíticas foi realizado em meios complexos enriquecidos com carboximetil celulose e lignina (Sigma- Aldrich), respectivamente, e o isolamento dos actinomicetos foi realizado em meio comercial (Ágar para isolamento de actinomicetos, BD Biosciences). Os meios utilizados para o isolamento das bactérias celulolíticas e lignolíticas foram preparados a partir de extratos dos diferentes tipos de solo e foram enriquecidos com carboximetil celulose ou lignina, como representado na figura 3. A composição e o modo de preparo do meio complexo para isolamento de bactérias celulolíticas e lignolíticas estão descritos a seguir:

Meio complexo para isolamento de bactérias celulolíticas (Wood, 1980) e lignolíticas (adaptação de Wood, 1980), para 1L de meio:

-5 g carboximetil celulose ou lignina

-1 g NH_4NO_3

-50 mL de solução salina 0,8%

-950 mL de extrato de solo*

-15 g de Ágar

*Extrato de solo: O solo foi ressuspensionado em água destilada (1:1) e agitado vigorosamente. Depois que houve a decantação das partículas maiores, o sobrenadante foi filtrado em papel filtro e o filtrado foi adicionado ao meio de cultura. O meio foi autoclavado por 20 min a 121° C.

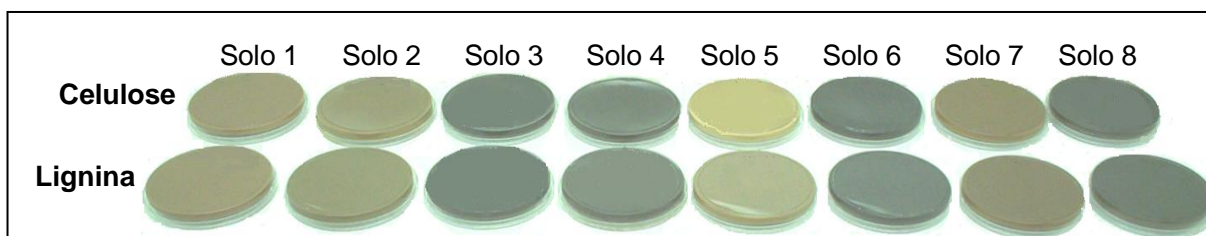


Figura 3: Meios preparados com extratos de solo enriquecidos com celulose ou lignina.

As contagens de bactérias totais e o isolamento dos morfotipos foram realizados a partir de suspensões preparadas com as amostras de solo. O inóculo foi preparado a partir de uma diluição decimal em série, adicionando-se 1g de cada amostra de solo a um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina a 0,85% estéril. Após a agitação da mistura, preparou-se a partir desta, diluições 10^{-2} a 10^{-6} , pelas sucessivas transferências de 1 mL da suspensão mais concentrada de solo para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina a 0,85%. De cada diluição, um volume igual a 0,1 mL foi estriado através da técnica de *spread plate*, em duplicata, em placas de Petri contendo os meios específicos para o isolamento das bactérias dos 3 grupos funcionais (1. Ágar para isolamento de actinomicetos, 2. meio complexo enriquecido com celulose e 3. meio complexo enriquecido com lignina). Para a contagem e isolamento das bactérias celulolíticas e lignolíticas, as suspensões foram inoculadas nos meios de cultivo preparados como o solo correspondente ao da suspensão. As placas foram incubadas por 3-7 dias a 27° C. As diluições que apresentaram entre 30 – 300 colônias foram utilizadas para a contagem das bactérias totais, bem como para o isolamento das colônias que apresentaram características morfológicas distintas, distinguidas com base na textura, relevo, pigmentação, tipo de borda ou tamanho. As colônias foram então repicadas e estriadas em ágar nutriente (BD Biosciences), no mínimo 3 vezes até a obtenção de cultura pura. A incubação das placas foi feita em estufa, na temperatura de 27° C por até 7 dias. Após a obtenção de cultura pura, estes isolados foram mantidos em caldo nutriente (BD Biosciences) com glicerol 1:3 a temperatura de -80° C.

3.3 Extração de DNA

Os micro-organismos foram crescidos em placa contendo Ágar soja (BD Biosciences) por até 3 dias a 27° C. Todas as colônias foram coletadas da placa com auxílio de uma alça bacteriológica, e um volume aproximado de 0,2 mL de pellet foi utilizado para a extração de DNA, realizado conforme protocolo descrito por Pitcher et al. (1989).

3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada utilizando-se dois iniciadores, pA e pH, desenhados para o anelamento em regiões conservadas nas extremidades do rRNA 16S de procariontes

(tabela 1), que amplificam um fragmento de aproximadamente 1500 pb. Os iniciadores se ligam nas regiões correspondentes 8 e 1541 do rRNA 16S de *Escherichia coli* (Thompson et al., 2001). A PCR foi realizada utilizando-se 25 ng de DNA genômico, 0,2 μ M de dNTPs, 1,5 mM $MgCl_2$ (Invitrogen), 1,25 U de DNA polimerase (Go Taq, Invitrogen), Tampão de PCR 1X (Invitrogen), 0,4 μ M de cada primer e água Milli-Q estéril para completar o volume de 50 μ l. A amplificação do rRNA 16S foi realizada no termociclador MasterCycler Gradient AG modelo 22331, Eppendorf. A desnaturação preliminar foi realizada em uma temperatura de 95° C por cinco minutos, sendo seguida por 30 ciclos térmicos de 95° C por 1,5 minuto, 60° C por 1 minuto e 72° C por 2 minutos. A extensão final ocorreu na temperatura de 72° C por 10 minutos, no final dos 30 ciclos.

Todas as reações realizadas apresentam um controle negativo (reação sem o DNA molde) e controle positivo (DNA molde conhecido e amplificável). Os produtos de PCR (5 μ l) e o marcador de peso molecular (2 μ l do Low Mass Ladder, Invitrogen) foram misturados com 2 μ l de tampão de carregamento (0,025 % de azul de bromofenol e 50 % de glicerol) e aplicados em gel de Agarose a 1% (p/v) com TBE 1% e brometo de etídio (0,5 μ g/mL). A corrida de eletroforese foi realizada por 40 minutos a 70 V. Os produtos de PCR foram visualizados em transiluminador e as imagens foram capturadas e registradas no fotodocumentador (Gel Logic 100 Imaging System).

3.5 Purificação e Quantificação do Produto de PCR

As bandas que correspondiam ao tamanho de fragmento esperado de 1,5 kb foram cortadas do gel de Agarose com o auxílio de uma espátula, e o produto de PCR foi purificado do gel com o Kit QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN). O rendimento da purificação foi verificado por eletroforese em gel de Agarose a 1 %, e os produtos foram quantificados no software (Molecular Imaging, Kodac MI), que fez uma estimativa da quantidade de produto purificado a partir de uma análise comparativa com as bandas do padrão Low Mass Ladder (Invitrogen). De acordo com a necessidade, o produto purificado foi concentrado em SpeedVac (SPD 1010 SpeedVac System, Thermo Savant) ou diluído com a solução de eluição, de maneira que um volume máximo de 6,3 μ l apresentasse entre 80 e 100 ng de DNA purificado. O volume final de DNA

purificado utilizado em cada reação de sequenciamento foi ajustado para 6,3 µl com água MilliQ.

3.6 Sequenciamento de DNA

As reações de sequenciamento foram preparadas em placas de 96 poços (ABI PRISM™). Cada reação apresentava entre 80- 100 ng de produto purificado em um volume máximo de 6,3 µl, 1,2 µl de iniciador a 2,7 pmol (tabela 1), 1 µl de ABI Prism Big Dye Terminator ready reaction mix e 1,5 µl de tampão de diluição (5 X), do kit (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing versão 3.1, Applied Biosystems). A princípio, sequências parciais de rRNA 16S foram obtidas de todos os isolados utilizando os iniciadores pA e 16R519 (tabela 1). Em seguida, após a análise filogenética, os isolados que apresentaram valores de similaridade do rRNA 16S $\leq 97\%$, foram submetidos a sequenciamento completo do rRNA 16S, utilizando-se os seguintes iniciadores, conforme a tabela 1: pA, pH, 16F536, 16F926, 16F1112, 16F1241, 16R339, 16R519 e 16R1093.

O controle do sequenciamento apresentava 0,5 µl DNA fita dupla pGEM®-3Zf(+), 2,0 µl do iniciador -21 M13, fornecidos pelo fabricante, além de 1 µl de ABI Prism Big Dye Terminator ready reaction mix, 1,5 µl de tampão de diluição 5 X e 5,0 µl de água livre de nuclease. O programa de sequenciamento empregado apresentava um total de 25 ciclos de 10 segundos a 96° C, 5 segundos a 50° C e 4 min a 60° C.

Os produtos gerados em cada um dos poços da placa foram incubados por 15 minutos com 80 µl de isopropanol a 75% à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram centrifugadas por 45 minutos a 4000 rpm a 21 °C (Centrifuga 5810R, Eppendorf) para precipitação. Os sobrenadantes foram descartados pela inversão das placas sobre papel toalha e as placas centrifugadas de forma invertida por 1 minuto a 900 rpm a 21 °C a fim de remover o sobrenadante residual. Em seguida, foram incubadas a 75° C por 5 minutos no termociclador para a secagem do material. A desnaturação foi realizada com 10 µl de formamida e a placa foi centrifugada por 1 minuto a 900 rpm a 21 °C, sendo submetida a mais um ciclo de secagem em termociclador a 95° C por 5 minutos. Subsequentemente, a placa foi colocada em

contato com gelo e imediatamente conduzida para o sequenciador automático. A separação dos fragmentos de DNA foi realizada com o ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems. O tempo e a voltagem utilizados na injeção da amostra foram de 10s e 1.6 kV. Cada corrida foi realizada a 60° C por 2,800 s a 5µAmps e 13,4 kV.

3.7 Reconstrução filogenética

Sequências parciais e totais do rRNA 16S, contendo aproximadamente 500 pb e 1500pb, respectivamente, foram utilizadas a fim de posicionar as amostras no espaço filogenético. Foram obtidas sequências-consenso através da sobreposição das sequências advindas de cada iniciador, com o auxílio da ferramenta *Genebuilder*, embutida no pacote do programa *Kodon* versão 2.03. A edição das sequências foi realizada com base na observação da intensidade dos picos presentes nos cromatogramas, e as sequências foram cortadas nas extremidades, nos pontos onde começou a ocorrer perda da qualidade. Eventuais erros incorporados à sequência foram corrigidos com base na sequência da fita complementar.

Depois de editadas, as sequências-consenso no formato fasta, foram submetidas à busca por similaridade nas bases de dados do NCBI (GenBank-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através da ferramenta Basic Local Alignment Search Tools (Blast) (Altschul et al., 1997) ou do SEQ Match do Ribossomal Database Project, RDP (Cole et al., 2007). O número de acesso das linhagens- tipo mais próximas foi obtido com base na lista de nomes validados publicada no LPSN (Euzèby, 2008). De posse deste número, as sequências de rRNA 16S das linhagens foram capturadas no NCBI, para fins de comparação. Uma árvore filogenética prévia foi gerada contendo as cinco sequências de rRNA 16S mais relacionadas às sequências dos isolados, entretanto, a árvore filogenética final só incluiu as sequências das linhagens – tipo mais relacionadas.

O alinhamento de todas as sequências foi realizado com o Clustal W (Thompson, Higgins & Gibson, 1994). A árvore filogenética e a matriz de similaridade foram geradas com o auxílio do MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007), com a opção de deleção completa. O modelo de reconstrução das árvores filogenéticas utilizado foi o Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987). As árvores foram construídas utilizando a distância

correta de Jukes & Cantor (1969), com base em uma matriz de similaridade calculada através da distância *p* (análise par a par). A topologia da árvore filogenética não enraizada resultante foi analisada com um valor de *bootstrap* baseado em 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento do gene rRNA 16S.

Iniciadores	Sequência de bases
PA	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
pH	5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'
16F536	5' CAGCAGCCGCGGTAATAC 3'
16F926	5' AACTCAAAGGAATTGACGG 3'
16F1112	5' AGTCCCGCAACGAGCGCAAC 3'
16F1241	5' GCTACACACGTGCTACAATG 3'
16R339	5' ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG 3'
16R519	5' GTATTACCGCGGCTGCTG 3'
16R1093	5' GTTGCGCTCGTTGCGGGACT 3'

3.8 Triagem das atividades celulolítica (endoglucanase) e lignolítica

Os isolados dos grupos funcionais celulolíticos, lignolíticos e actinomicetos foram caracterizados quanto à presença de celulases e ligninases. Para isso, as colônias foram retiradas do estoque e enriquecidas em caldo soja, sendo incubadas com agitação por até 3 dias a 27° C. Após a observação da turvação do meio de cultura, a suspensão foi repicada em Ágar soja e as placas foram incubadas por 3 dias a 27° C. Um segundo repique na forma de spot foi realizado a partir do crescimento obtido em placa, em meio mínimo de sais suplementado com carboximetil celulose, para a triagem da atividade celulolítica, e em meio mínimo suplementado com lignina, para a triagem da atividade lignolítica. Uma placa contendo Ágar soja também foi inoculada nesta segunda etapa, para o controle do crescimento. As placas de celulose foram incubadas por 15 dias e as de lignina foram incubadas por até 3 dias, a 27 °C. Os repiques nos meios específicos foram realizados duas vezes consecutivas, de forma a esgotar todo o carbono que pudesse ter sido armazenado durante o crescimento da bactéria no meio com soja. A

composição e o modo de preparo do meio mínimo utilizado para triagem das atividades enzimáticas estão descritos a seguir:

Meio mínimo à base de sais suplementado com celulose ou lignina (g/L)*:

- 1,2g de NaNO₃
- 3,0g de KH₂PO₄
- 6,0g de K₂HPO₄
- 0,2g de MgSO₄. 7H₂O
- 0,05g de CaCl₂. 2H₂O
- 0,001g ZnSO₄. 7H₂O
- 0,01g de MnSO₄. 7H₂O
- 1,0 g de extrato de levedura
- 10,0 g de carboximetil celulose ou lignina
- 15 g de Ágar

* O meio foi preparado pela adição dos sais na ordem apresentada, os quais eram completamente solubilizados após a adição de cada substância para evitar a precipitação. O pH final da solução foi ajustado para 7,0 com 0,1M de HCl ou NaOH. O meio foi autoclavado por 20 min a 121° C.

A capacidade de metabolização dos compostos foi avaliada a partir da observação de crescimento nos meios específicos. Na triagem para verificação da degradação de celulose, o revelador de vermelho congo também foi adicionado a fim de se avaliar a extensão e a intensidade das zonas hidrolíticas formadas (Teather e Wood 1982). Foram adicionados aproximadamente 3 mL de solução aquosa de Vermelho Congo a 0,1%, as quais ficaram em contato com o meio por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, o excesso de vermelho congo foi removido, e as placas foram lavadas por até 3 vezes com 15 mL de tampão fosfato pH 7,0 a 50 mM com 1M de NaCl. Assim, tornou-se possível observar a extensão das zonas hidrolíticas. Nas regiões onde ocorreu degradação de celulose, foram evidenciadas zonas claras, contendo os halos de degradação, pois o corante vermelho congo deixava de se associar em função de sua especificidade por ligações do tipo β - 1,4 glucose (Wood, 1980).

4 RESULTADOS

Neste trabalho foram obtidos resultados referentes à caracterização taxonômica de bactérias cultiváveis obtidas de diferentes tipos de solo da Mata Atlântica, no PARNASO. As características químicas de cada tipo de solo foram avaliadas, evidenciando algumas diferenças. O isolamento dos micro-organismos foi realizado tanto em meio seletivo para crescimento de actinomicetos quanto em meios complexos enriquecidos com celulose e lignina. A quantidade de bactérias totais e de morfotipos bacterianos foi avaliada, bem como a capacidade de degradação de celulose e de lignina da dos isolados da coleção resultante.

4.1 Análises químicas dos solos

Os parâmetros referentes às análises químicas do solo, bem como os pontos de coleta correspondentes encontram-se definidos na tabela 2. Observou-se que todos os solos analisados apresentaram pH ácido (< 5,3) e os teores de Al, P, K, CaAA, MgAA, H+AL e de matéria orgânica, apresentaram-se variáveis de acordo com o ponto de coleta, nas faixas de 0,86-3,94; 0,14-11,06; 11,08-88,63; 0,01-0,31; 0,04-0,14; 3,91-18,50 e 1,23-16,90, respectivamente.

Tabela 2. Parâmetros químicos dos solos analisados.

Ponto de Coleta	Tipo de Solo (profundidade)	pH H ₂ O	Al*	P**	K**	CaAA*	MgAA*	H+Al*	Matéria Orgânica (%)
01	Bonfim - traço amarelo (11 cm)	4,91	0,86	0,15	13,6	0,08	0,06	4,19	1,41
02	Bonfim- traço vermelho (4 cm)	4,93	1,02	0,14	39,28	0,31	0,05	3,91	1,23
03	Ájax -preto (10 cm)	4,91	2,84	2,11	59,42	0,09	0,07	14,22	7,32
04	Torto - Vale alta preta (4 cm)	3,84	3,40	9,15	45,32	0,22	0,11	17,50	8,54
05	Cavalinho (5 cm)	4,37	1,71	0,74	16,12	0,05	0,04	8,16	2,59
06	Campo Úmido (5 cm)	4,58	3,94	6,30	88,63	0,17	0,14	18,50	16,90
07	Abrigo 3 (5 cm)	5,23	0,61	6,64	44,32	0,01	0,06	6,72	1,90
08	Floresta parte baixa (0 -10 cm)	4,56	1,69	11,06	11,08	0,02	0,04	13,20	3,69

Unidades: * mE/ 100cc; ** mg/ L

4.2 Quantificação de bactérias totais e de morfotipos bacterianos

O número de colônias de bactérias totais variou de 10^6 a 10^8 UFC/g de solo (Tabela 3). O meio utilizado para o isolamento das bactérias celulolíticas recuperou a maior quantidade de bactérias, e as contagens se distribuíram na faixa de $10^7 - 10^8$ UFC/g de solo, valores maiores do que os observados nos demais meios de isolamento, que se apresentaram principalmente na faixa de 10^6 (UFC/g).

Em relação aos morfotipos, o meio utilizado para o isolamento de actinomicetos foi o que recuperou a maior quantidade de colônias com morfologias diferentes, de onde foram obtidos 127 isolados (Tabela 3). No ponto de coleta 6, observou-se a maior variabilidade de morfotipos, totalizando em 50 o número de colônias recuperadas.

Tabela 3. Quantificação de bactérias totais (UFC/g) e de morfotipos bacterianos em solos da Mata Atlântica de acordo com o grupo funcional e o ponto de coleta.

Ponto de Coleta	Bactérias Totais (UFC/g)			Morfotipos Bacterianos		
	CEL *	LIG *	ACT *	CEL *	LIG *	ACT *
01	1×10^7	4×10^6	3×10^6	03	05	10
02	8×10^6	3×10^6	6×10^6	02	08	17
03	1×10^8	1×10^6	1×10^6	10	03	08
04	1×10^7	1×10^8	8×10^6	11	05	21
05	8×10^6	1×10^6	6×10^6	03	05	12
06	2×10^7	1×10^7	7×10^6	14	10	26
07	1×10^7	2×10^6	5×10^6	12	03	22
08	1×10^8	1×10^6	7×10^6	08	12	11
Total				63	51	127

* Identificação presuntiva dos grupos funcionais (CEL: celulolíticas, LIG: lignolíticas e ACT: actinomicetos), baseada no crescimento da colônia em meio enriquecido com celulose (Wood, 1980), lignina e em Ágar para isolamento de actinomicetos, respectivamente.

4.3 Identificação das bactérias lignocelulolíticas

As árvores filogenéticas resultantes dos alinhamentos das sequências de rRNA 16S encontram-se representadas nas figuras 4 a, b e c. Conforme pode ser observado, os

micro-organismos obtidos dos diferentes meios de cultivo se distribuíram nas três árvores filogenéticas, não ocorrendo especificidade de isolados obtidos nos meios utilizados para o isolamento em nenhuma das árvores resultantes. Entretanto, observou-se uma tendência, com predominância dos isolados obtidos no Ágar para isolamento de actinomicetos (ACT) no filo *Actinobacteria* e daqueles provenientes do meio enriquecido com celulose (CEL) no filo *Proteobacteria*. Os micro-organismos isolados do meio enriquecido com lignina (LIG) apresentaram uma distribuição igualitária nos filios *Proteobacteria* e *Firmicutes*.

Ao todo, foram sequenciados rRNAs 16S de 77 isolados que foram alocados em 24 gêneros distintos (figura 4). Todos os clusters representativos dos gêneros ficaram claramente definidos, com altos valores de *bootstrap*. Na árvore filogenética representativa do filo *Actinobacteria* (figura 4a), a maioria dos isolados se distribuiu nos gêneros *Streptomyces* sp., *Mycobacterium* sp. e *Arthrobacter* sp. No filo *Firmicutes* (figura 4b), uma quantidade semelhante de isolados foi encontrada nos três gêneros resultantes, *Paenibacillus*, *Staphylococcus* e *Bacillus*. A maioria dos isolados (aproximadamente 43%), no entanto, se relacionou taxonomicamente ao filo *Proteobacteria* (figura 4c), observando-se neste filo a ocorrência de metade do número total dos gêneros (12) e de pouco menos da metade das sequências de rRNA 16S analisadas (33). *Burkholderia* foi o gênero que apareceu com maior frequência, concentrando praticamente 16% de todos os isolados analisados.

As sequências de rRNA 16S dos isolados ACT 2BA, CEL 4ABC, ACT 4EA, CEL 7EAA, CEL 7EB e CEL 8DAB apresentaram diferenças significativas quando comparadas às sequências das espécies bacterianas já descritas na literatura. A distância filogenética observada, na maioria dos casos, foi maior que 2% que é um valor muito próximo do limite de 3% que é utilizado para a definição de espécie nova (tabela 4).

Alguns grupos taxonômicos foram recuperados de diferentes pontos de coleta no PARNASO, sugerindo sua ubiquidade na Mata Atlântica, porém outras técnicas tais como PFGE ou rep-PCR devem ser feitas para confirmar esta hipótese. O gênero *Burkholderia*, por exemplo, foi recuperado de 6 tipos de solo, enquanto que *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter* e *Bacillus*, ocorreram em 4 solos distintos. Outros gêneros, entretanto, como *Kitasatospora*, *Leifsonia*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*,

Variovorax, *Cupriavidus*, *Ralstonia* e *Collimonas* apresentaram distribuição mais restrita. *Amycolaptosis*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Microbacterium*, *Phyllobacterium*, *Paracoccus*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Dyella*, *Stenotrophomonas* e *Collimonas*, por outro lado, foram encontrados em um único tipo de solo.

Uma ampla distribuição geográfica também foi observada em níveis hierárquicos taxonômicos inferiores. A análise da matriz de similaridade (dados não mostrados), demonstrou a ocorrência de sequências de rRNA 16S idênticas (100% de similaridade) em solos distintos. Esta situação foi observada nos seguintes grupos de isolados: *Mycobacterium* sp.: CEL 1C/ CEL 3IAAA/ CEL 8ABB; *Bacillus* sp.: CEL 3FAAA/ CEL 6CBAAA; *Variovorax* sp.: CEL 3H/ CEL 7F; *Cupriavidus* sp.: ACT 4N/ ACT 5K/ LIG 5A; *Ralstonia* sp.: LIG 1F/ LIG 2AAAB; *Burkholderia* sp.: ACT 1A/ LIG 2AAAAA/ CEL 3FAB/ CEL 4CAAB e CEL 3BA/ CEL 6MB/ CEL 7A. Apesar deste panorama também ter sido observado para isolados obtidos do mesmo solo, estes foram excluídos das análises posteriores, sendo considerados réplicas.

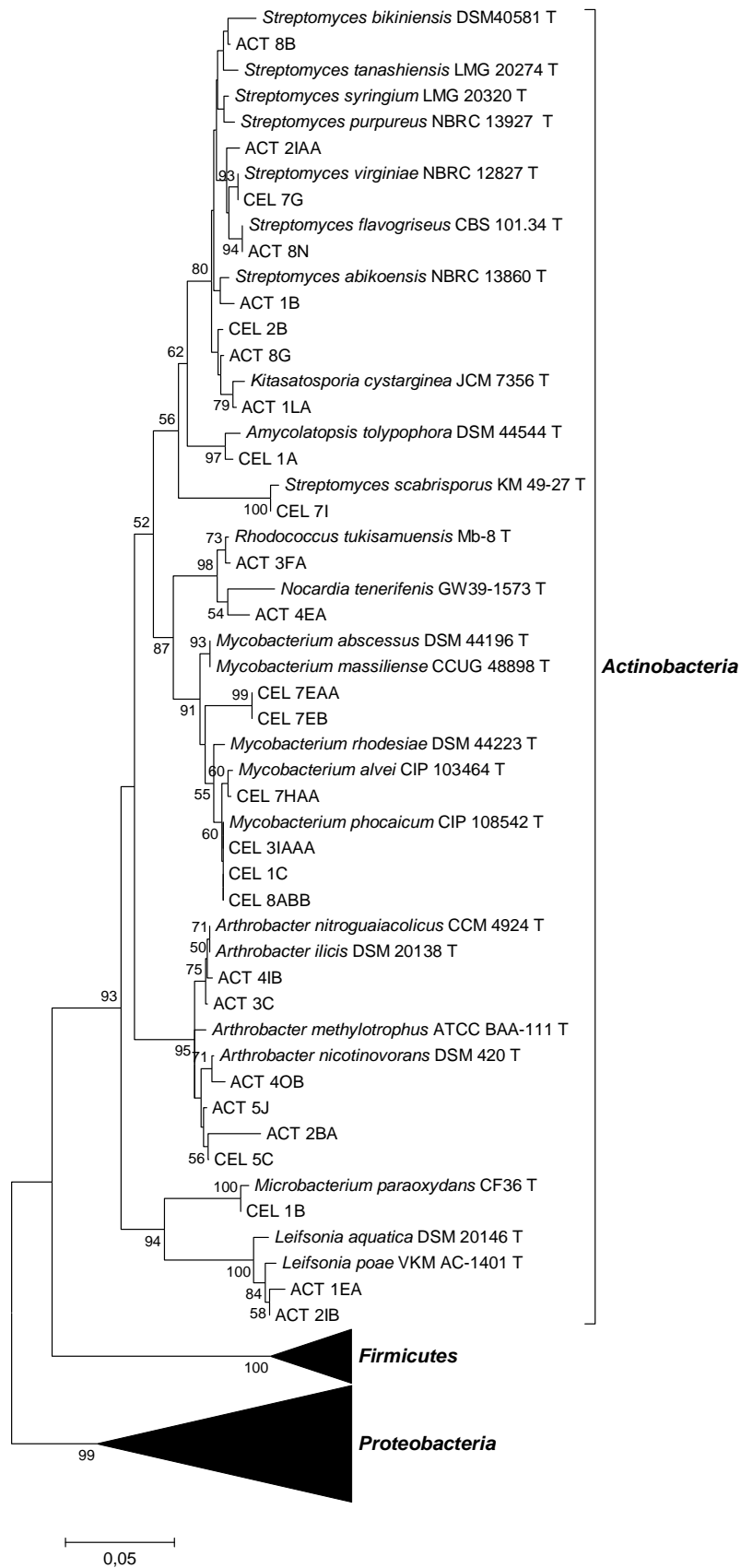


Figura 4a

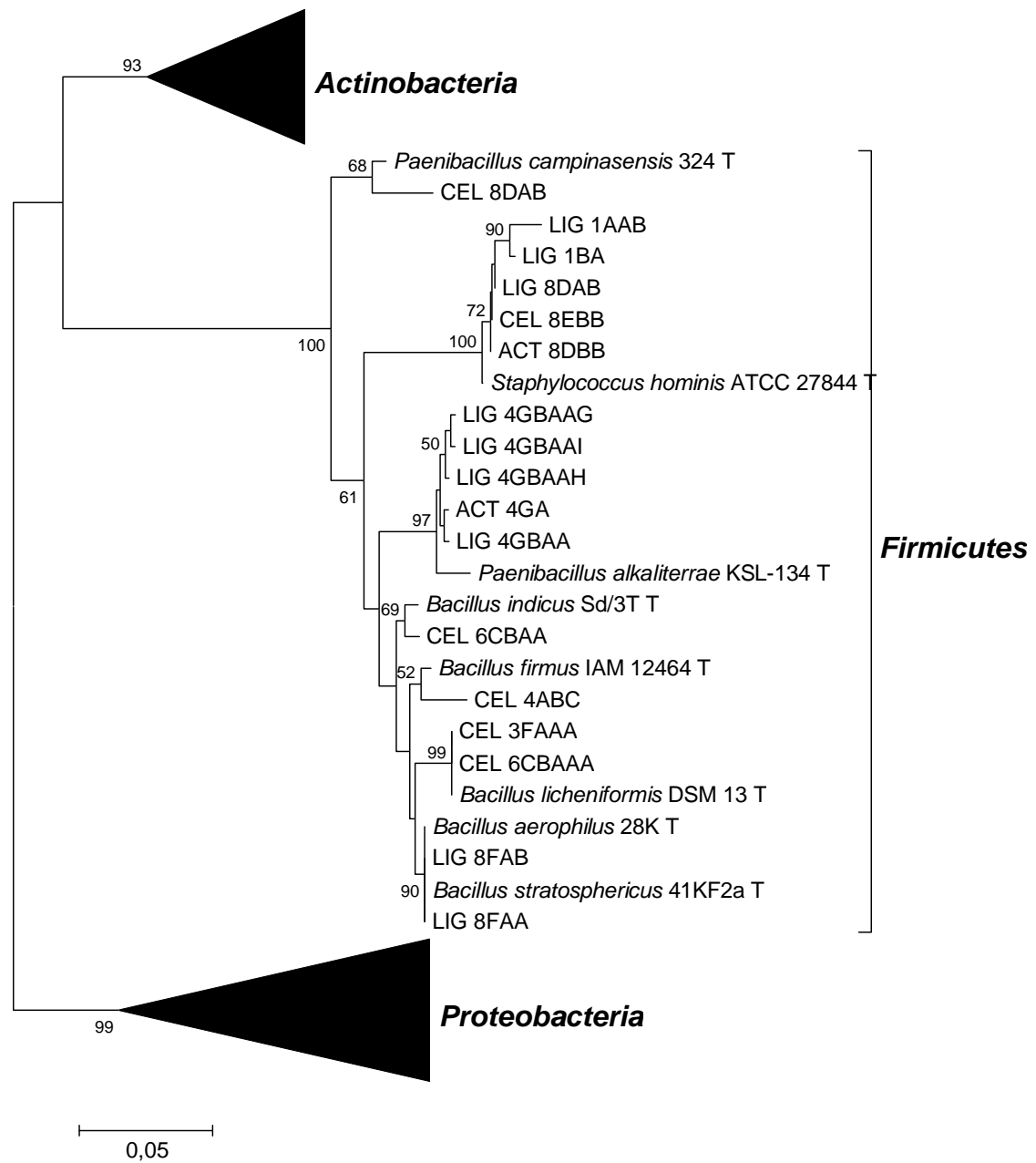


Figura 4b

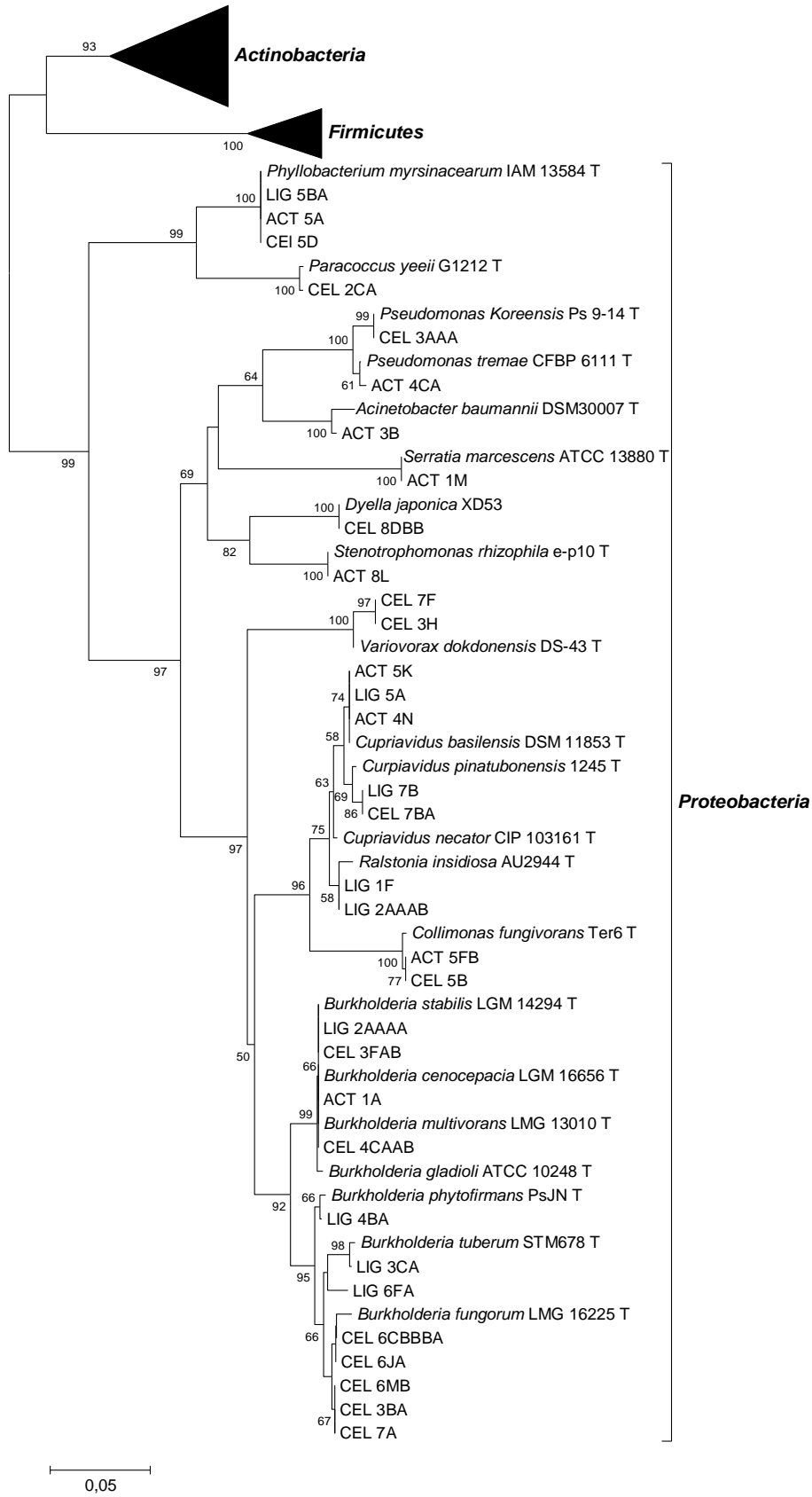


Figura 4c

Figuras 4a, b e c: Árvores de Neighbor Joining representativas dos filos *Actinobacteria* (4a) *Firmicutes* (4b) e *Proteobacteria* (4c), baseadas em sequências parciais do gene rRNA 16S de linhagens tipo e de isolados pertencentes aos grupos funcionais de bactérias celulolíticas, lignolíticas e actinomicetos. A significância está representada pelo valor de bootstrap (%) calculado com base em 1000 réplicas. Apenas valores acima de 50% estão representados. A barra da escala representa 5% de diferença. A nomenclatura dos isolados foi estabelecida fazendo referência ao grupo funcional putativo (CEL, celulolíticas; LIG, lignolíticas; ACT, actinomicetos), ao solo de origem (números variando de 1 a 8) e ao morfotipo, representado pelas letras.

4.4 Caracterização das atividades celulolítica (endoglucanase) e lignolítica

A maioria dos isolados avaliados para a capacidade de degradação de carboximetil celulose (90%) demonstrou esta atividade (Tabela 4). As únicas exceções encontradas foram observadas entre os seguintes isolados: ACT 5FB (*Collimonas* sp.), CEL 7BA (*Cupriavidus* sp.), ACT 2IAA (*Streptomyces* sp.), ACT 2BA (*Arthrobacter* sp.) e ACT 1EA/ ACT 2IB (*Leifsonia* sp.). No entanto, é importante notar que, com exceção do gênero *Leifsonia*, para o qual não foi observado nenhum isolado capaz de degradar carboximetil celulose, nos demais gêneros esta característica não foi extensiva aos outros isolados. Assim, o metabolismo da carboximetil celulose parece ser espécie-específico. Alguns exemplos de halos de degradação de celulose obtidos em meio mínimo suplementado com carboximetil celulose estão apresentados na figura 5.

A capacidade de degradação da lignina, por outro lado, se mostrou limitada a alguns grupos e dos 54 isolados que foram testados, apenas 20% mostraram-se capazes de degradá-la. É possível que o metabolismo da lignina esteja associado ao da celulose, uma vez que foi observado neste estudo que os micro-organismos capazes de degradar a lignina também apresentaram atividade celulolítica.

A maioria dos isolados capazes de metabolizar a lignocelulose pertence ao filo *Proteobacteria*, nos gêneros: *Pseudomonas* sp. (ACT 3AAA e ACT 4CA), *Serratia* sp. (ACT 1M), *Acinetobacter* sp. (ACT 3B), *Variovorax* sp. (CEL 3H), *Cupriavidus* sp. (ACT 5K), *Collimonas* sp. (CEL 5B), *Burkholderia* sp. (ACT 1A) e *Phyllobacterium* sp. (LIG 5BA). Entretanto, no filo *Actinobacteria* também foram observados isolados com capacidade de metabolizar estes dois compostos, agrupados com os gêneros *Kitasatospora* sp. (ACT 1LA) e *Arthrobacter* sp. (ACT 5J).

Tabela 4. Lista dos isolados obtidos dos diferentes solos contendo as alocações filogenéticas baseadas no sequenciamento do rRNA 16S e as atividades de celulases (endoglucanase) e ligninase. N/D: Não determinado.

Solo de Origem	Isolado	Metabolismo		Percentual de similaridade com a espécie mais relacionada (nº de acesso)	Gênero
		CMC	Lignina		
Ponto 1: Bonfim, Traço amarelo					
	CEL 1ª	+	-	99% (AJ508241)	<i>Amycolaptopsis</i> sp.
	CEL 1B	+	-	99,7% (AJ491806)	<i>Microbacterium</i> sp.
	CEL 1C	+	-	100% (AY859682)	<i>Mycobacterium</i> sp.
	LIG 1AAB	+	-	98,7% (L37601)	<i>Staphylococcus</i> sp.
	LIG 1BA	+	-	99,4% (L37601)	<i>Staphylococcus</i> sp.
	LIG 1F	+	-	99,4% (AF488779)	<i>Ralstonia</i> sp.
	ACT 1ª	+	+	100% (AF148554) 100% (Y18703) 100% (AY677087)	<i>Burkholderia</i> sp.
	ACT 1B	+	-	98,4% (AJ781348)	<i>Streptomyces</i> sp.
	ACT 1EA	-	-	99% (AF116342)	<i>Leifsonia</i> sp.
	ACT 1LA	+	+	99,4% (U93318)	<i>Kitasatospora</i> sp.
	ACT 1M	+	+	100% (M59160)	<i>Serratia</i> sp.
Ponto 2: Bonfim, Traço vermelho					
	CEL 2B	+	-	99% (AJ781348)	<i>Streptomyces</i> sp.
	CEL 2CA	+	-	99,7 (AY014173)	<i>Paracoccus</i> sp.
	LIG 2AAAA	N/D	N/D	100% (AF148554) 100% (Y18703) 100% (AY677087)	<i>Burkholderia</i> sp.
	LIG 2AAAB	N/D	N/D	99,4% (AF488779)	<i>Ralstonia</i> sp.
	ACT 2BA	-	-	97,1% (X80743)	<i>Arthrobacter</i> sp.
	ACT 2IAA	-	-	99% (D85123)	<i>Streptomyces</i> sp.
	ACT 2IB	-	-	99% (AF116342)	<i>Leifsonia</i> sp.
Ponto 3: Ajax Preto					
	CEL 3AAA	+	+	100% (AF468452)	<i>Pseudomonas</i> sp.
	CEL 3BA	+	-	99% (AF215705)	<i>Burkholderia</i> sp.
	CEL 3FAAA	+	-	100% (X68416)	<i>Bacillus</i> sp.
	CEL 3FAB	+	-	100% (AF148556) 100% (AF148554)	<i>Burkholderia</i> sp.
	CEL 3H	+	+	99% (DQ178978)	<i>Variovorax</i> sp.
	CEL 3IAAA	+	N/D	100% (AY859682)	<i>Mycobacterium</i> sp.
	LIG 3CA	N/D	N/D	99,7% (AJ302311)	<i>Burkholderia</i> sp.
	ACT 3B	+	+	98,7% (X81660)	<i>Acinetobacter</i> sp.
	ACT 3C	+	-	99,7% (AJ512504) 99,7% (X83407)	<i>Arthrobacter</i> sp.
	ACT 3FA	N/D	N/D	99,7% (AB067734)	<i>Rhodococcus</i> sp.

Continuação da tabela 4.

Solo de Origem	Isolado	Metabolismo		Percentual de similaridade com a espécie mais relacionada (n ^o de acesso)	Gênero
		Celulose	Lignina		
Ponto 4: Torto, Vale alta preta					
	CEL 4ABC	+	-	98,1% (D16268)	<i>Bacillus</i> sp.
	CEL 4CAAB	+	-	100% (AF148554) 100% (Y18703) 100% (AY677087)	<i>Burkholderia</i> sp.
	LIG 4BA	N/D	N/D	99,7% (AY497470)	<i>Burkholderia</i> sp.
	LIG 4GBAA	+	-	99% (AY960748)	<i>Paenibacillus</i> sp.
	LIG 4GBAAG	+	-	98,4 (AY960748)	<i>Paenibacillus</i> sp.
	LIG 4GBAAH	+	-	98,4 (AY960748)	<i>Paenibacillus</i> sp.
	LIG 4GBAAI	+	-	98,7 (AY960748)	<i>Paenibacillus</i> sp.
	ACT 4CA	+	+	99,7 (AJ492826)	<i>Pseudomonas</i> sp.
	ACT 4EA	+	-	97,1% (AJ556157)	<i>Nocardia</i> sp.
	ACT 4GA	+	-	98,7% (AY960748)	<i>Paenibacillus</i> sp.
	ACT 4IB	+	-	99,7% (AJ512504) 99,7% (X83407)	<i>Arthrobacter</i> sp.
	ACT 4N	+	-	100% (AF312022)	<i>Cupriavidus</i> sp.
	ACT 4OB	+	-	99,3% (X80743)	<i>Arthrobacter</i> sp.
Ponto 5: Cavalinho					
	CEL 5B	+	+	99,4% (AJ310394)	<i>Collimonas</i> sp.
	CEL 5C	+	-	99,4% (X80743)	<i>Arthrobacter</i> sp.
	CEL 5D	+	N/D	100% (D12789)	<i>Phylobacterium</i> sp.
	LIG 5A	+	-	98,7% (AF312022)	<i>Cupriavidus</i> sp.
	LIG 5BA	+	+	100% (D12789)	<i>Phyllobacterium</i> sp.
	ACT 5A	+	-	100% (D12789)	<i>Phyllobacterium</i> sp.
	ACT 5FB	-	-	99,7% (AJ310394)	<i>Collimonas</i> sp.
	ACT 5J	+	+	99,3% (AF235090)	<i>Arthrobacter</i> sp.
	ACT 5K	+	+	100% (AF312022)	<i>Cupriavidus</i> sp.
Ponto 6: Campo Úmido					
	CEL 6CBAA	+	-	100% (X68416)	<i>Bacillus</i> sp.
	CEL 6CBAAA	+	N/D	98,7% (AJ583158)	<i>Bacillus</i> sp.
	CEL 6CBBBA	N/D	N/D	99% (AF215705)	<i>Burkholderia</i> sp.
	CEL 6JA	+	-	98,7% (AF215705)	<i>Burkholderia</i> sp.
	CEL 6MB	N/D	N/D	99% (AF215705)	<i>Burkholderia</i> sp.
	LIG 6FA	+	-	98,4% (AF215705)	<i>Burkholderia</i> sp.

Continuação da tabela 4.

Solo de Origem	Metabolismo			Percentual de similaridade com a espécie mais relacionada (n° de acesso)	Gênero
	Isolado	Celulose	Lignina		
Ponto 7: Abrigo 3					
	CEL 7A	+	-	99% (AF215705)	<i>Burkholderia</i> sp.
	CEL 7BA	-	-	99,3% (ABI121221)	<i>Cupriavidus</i> sp.
	CEL 7EAA	+	N/D	97,4% (AJ536038)	<i>Mycobacterium</i> sp.
				97,4% (AY593980)	
	CEL 7EB	+	N/D	97,4% (AJ536038)	<i>Mycobacterium</i> sp.
				97,4% (AY593980)	
	CEL 7F	N/D	N/D	99% (DQ178978)	<i>Variovorax</i> sp.
	CEL 7G	+	N/D	100% (D85123)	<i>Streptomyces</i> sp.
	CEL 7HAA	+	N/D	99,7% (AF023664)	<i>Mycobacterium</i> sp.
				99,7% (AY859682)	
	CEL 7I	N/D	N/D	99,7 (AB249946)	<i>Streptomyces</i> sp.
	LIG 7B	N/D	N/D	98,7% (AF191737)	<i>Cupriavidus</i> sp.
Ponto 8: Floresta parte Baixa					
	CEL 8ABB	+	N/D	100% (AY859682)	<i>Mycobacterium</i> sp.
	CEL 8DAB	+	N/D	97,4% (AF021924)	<i>Paenibacillus</i> sp.
	CEL 8DBB	+	N/D	100% (AB110498)	<i>Dyella</i> sp.
	CEL 8EBB	+	-	100% (L37601)	<i>Staphylococcus</i> sp.
	LIG 8DAB	N/D	N/D	100% (L37601)	<i>Staphylococcus</i> sp.
	LIG 8FAA	N/D	N/D	100% (AJ831841)	<i>Bacillus</i> sp.
				100% (AJ831844)	
	LIG 8FAB	N/D	N/D	100% (AJ831841)	<i>Bacillus</i> sp.
				100% (AJ831844)	
	ACT 8B	+	-	99,3% (AJ781375)	<i>Streptomyces</i> sp.
	ACT 8DBB	+	-	100% (L37601)	<i>Staphylococcus</i> sp.
	ACT 8G	+	-	99% (AJ781348)	<i>Streptomyces</i> sp.
	ACT 8L	+	-	100% (AJ293463)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
	ACT 8N	+	-	100% (AJ494864)	<i>Streptomyces</i> sp.



Figura 5. Placas contendo alguns halos de degradação da celulose.

5 DISCUSSÃO

Trabalhos sobre a diversidade microbiana no solo do PARNASO são escassos. O domínio de Mata Atlântica remanescente situado no PARNASO apresentou uma grande variabilidade associada revelando a importância da existência desta Unidade de Conservação para a manutenção da biodiversidade microbiana do Brasil. Na coleção de bactérias lignocelulolíticas construída a partir de amostras de solo da Mata Atlântica, foi observada a ocorrência de isolados representando três filos: *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*. Muitos gêneros associados a estes filos desempenham papéis ecológicos fundamentais e apresentam alto potencial de exploração biotecnológica. Alguns dos isolados obtidos apresentaram diferenças em termos de sequências de rRNA 16S com as espécies já descritas, sugerindo a ocorrência de espécies novas.

5.1 Densidade Populacional de Bactérias Lignocelulolíticas

Os resultados obtidos encorajam o desenvolvimento de outros trabalhos abordando a biodiversidade deste importante grupo funcional de bactérias, pois demonstram abundância de morfotipos e de UFC/g associada a todos os solos. Na Mata Atlântica, a densidade populacional observada variou de 10^6 a 10^8 UFC/ g, sendo mais alta que a observada por Ulrich, Kimkle & Wirth (2008) em solos arenosos e argilosos tratados com adubo orgânico (1×10^6 UFC/g). Entretanto, não se pode descartar a possibilidade das condições de cultivo e de isolamento terem influenciado os resultados, pois o meio de isolamento utilizado por Ulrich, Kimkle & Wirth (2008) foi suplementado com um tipo de celulose mais complexa que a carboximetil celulose, a celulose coloidal preparada a partir de celulose natural (fibra de cóton), e talvez esta diferença justifique os valores mais baixos obtidos.

5.2 Grupos Taxonômicos

As florestas tropicais concentram a maior biodiversidade mundial (Myers, 2000). Considerando a importância e a representatividade dos micro-organismos na Terra (Whitman, Coleman & Wiebe, 1998), espera-se encontrar grandes quantidades de

espécies associadas a esses ecossistemas. Foi observada uma grande variabilidade de gêneros bacterianos na Mata Atlântica, sendo obtidos ao todo 24 gêneros distintos, dos quais 12 no filo *Proteobacteria*, 10 gêneros no filo *Actinobacteria* e 3 gêneros no filo *Firmicutes*.

A quantidade de gêneros obtida de cada um dos filos foi semelhante à esperada para solos de regiões tropicais. Um trabalho realizado na China, por exemplo, recuperou 10 gêneros de *Actinobacteria* de três florestas tropicais (Xu, Li & Jiang, 1996). Na Floresta Amazônica, Medau (2007) ao estudar bactérias Gram- negativas, obteve um total de 9 gêneros, todos relacionados ao filo *Proteobacteria*. No sul do Brasil, associados a plantações de trigo, foram obtidos 2 gêneros com capacidade de fixação de nitrogênio (Beneduzi, et al., 2008), relacionados ao filo *Firmicutes*. Sendo assim, os meios empregados para o isolamento, apesar de serem seletivos para um grupo funcional de bactérias, recuperaram quantidades equivalentes às esperadas para solos de regiões tropicais, de uma maneira geral.

Proteobacteria

A maioria dos isolados obtidos pertence ao filo *Proteobacteria*. Neste filo, foram obtidos isolados pertencentes aos gêneros *Phylobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Dyella*, *Stenotrophomonas*, *Variovorax*, *Cupriavidus*, *Ralstonia*, *Collimonas* e *Burkholderia*. O filo *Proteobacteria* compreende bactérias Gram-negativas e é caracterizado pela ocorrência de bactérias com ampla diversidade metabólica, podendo ser observados organismos quimio-organotróficos, fototróficos e quimiolitotróficos. A maioria dos gêneros deste filo é bem descrita por sua associação com o solo.

Alguns dos gêneros observados no PARNASO já haviam sido descritos em outras regiões do Brasil. Na Floresta Amazônica, por exemplo, já havia sido descrita a ocorrência de 7 gêneros em comum com os observados na Mata Atlântica (Medau, 2007). Neste trabalho, realizado em um tipo de solo típico da Amazônia rico em matéria orgânica, além de ocorrer grande variabilidade de *Burkholderia* associada também foram observados outros gêneros em comum como *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Serratia*, *Dyella*, *Ralstonia* e *Stenotrophomonas*.

Burkholderia foi o gênero encontrado com maior frequência e ampla distribuição no PARNASO, totalizando em 13 o número de isolados que ocorreram em 6 tipos de solo diferentes. Em conjunto com o trabalho de Medau (2007), estes dados demonstram a ampla distribuição geográfica de *Burkholderia* no Brasil. Este gênero apresenta muita facilidade de adaptação a diversos ambientes, e por conta disso a ampla distribuição de *Burkholderia* também pode ser observada em outros lugares (Estrada-de-Los-Santos, Bustillos-Cristales & Caballero-Mellado, 2001). Acredita-se que a facilidade de adaptação (Coenye & Vandamme, 2003; Parke & Gurian-Sherman, 2001) esteja relacionada ao seu genoma, que além de ser muito complexo, apresenta grande plasticidade (Holden et al., 2004). Várias sequências de inserção podem ser encontradas, o que pode acarretar um aumento na ocorrência de mutações e de recombinações (Cheng & Lessie, 1994; Lessie et al., 1996). Além disso, diferentes tipos de associação com o solo já foram descritas para este gênero. Podem ocorrer na forma de vida livre na rizosfera, como endofíticos ou fitopatógenos, e a fixação de nitrogênio também já foi descrita (Caballero-Mellado et al., 2007). Além disso, algumas destas bactérias se associam a fungos fitopatogênicos e a insetos de plantas, sendo interessantes como agentes de biocontrole e na biorremediação de xenobióticos (Coenye & Vandamme, 2003). Sua importância clínica também é bem descrita em humanos (Coenye & Vandamme, 2003) e estes micro-organismos também já foram encontrados mais recentemente em ambientes aquáticos (Compant et al., 2008).

Actinobacteria

No filo *Actinobacteria*, foi observada uma maior distribuição dos isolados nos gêneros *Streptomyces*, *Mycobacterium* e *Arthrobacteria*, apesar de também terem ocorrido isolados que se agruparam com os gêneros *Kitasatospora*, *Amycolaptopsis*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Microbacterium* e *Leifsonia*. Este filo se caracteriza por apresentar bactérias Gram-positivas com alto conteúdo G+C associado ao DNA. Os gêneros desse filo de maneira geral também são encontrados com frequência no solo, apresentam variabilidades morfológica, fisiológica e metabólica além de produzirem muitas enzimas extracelulares e metabólitos secundários (Ventura et al., 2007). Em um trabalho realizado em outra floresta tropical, por exemplo, foi observada a ocorrência de uma grande variabilidade de *Actinobacteria*, com predominância de *Streptomyces* entre

os isolados (Xu, Li & Jang, 1996). Entretanto, foi observado um perfil bacteriano diferente do encontrado na Mata Atlântica, pois só foi observada sobreposição de três gêneros (*Streptomyces*, *Nocardia* e *Rhodococcus*). No Brasil, por outro lado, já havia sido relatado por Semêdo e colaboradores (2001) a ocorrência de *Amycolaptosis* e *Streptomyces* entre bactérias com potenciais aplicações industriais, além de uma espécie do gênero *Kitasatospora* spp., por Groth e colaboradores (2004), no Brasil, em associação com o solo.

O gênero *Streptomyces* correspondeu ao grupo mais comumente encontrado no filo *Actinobacteria*. Podem ser encontradas neste gênero muitas espécies com potencial de produção de antibióticos. Esta característica marcante do gênero possui um papel ecológico relevante, pois é fundamental para a defesa da bactéria e para sua adaptação às condições hostis encontradas no solo (Davelos, Kinkel & Samac, 2004). Atualmente, a produção de antibióticos por *Streptomyces* tornou-se alarmante sob o ponto de vista de resistência microbiana, em função da descrição de um sistema de conjugação específico para este gênero (Grohmann, Muth & Espinosa, 2003). Outras características compartilhadas pelo gênero, compreendem a metabolização de polímeros complexos como quitina e lignina, e sua atuação como agentes de biocontrole (Weller et al., 2002; Lehr et al., 2008), em função da ocorrência de associações destas bactérias com hifas de fungos e plantas.

O gênero *Mycobacterium* também foi observado com frequência em vários solos. As espécies deste gênero apresentam uma composição de envelope celular atípica com moléculas de ácido micólico, característica que é compartilhada com outros gêneros (*Nocardia* e *Corynebacterium*), que juntos, formam um clado monofilético dentro do filo *Actinobacteria*. (Embley & Stackebrandt, 1994). Além disso, bactérias do gênero *Mycobacterium* podem apresentar crescimento rápido ou lento, podem ser encontradas no solo ou na água, e em geral são de vida livre apesar de algumas espécies serem conhecidas por seu potencial patogênico para o homem (Madigan, Martinko & Parker, 1996).

O gênero *Arthrobacter* é um dos gêneros mais frequentemente associados a ambientes terrestres. Aparece como bastonete Gram- negativo em culturas novas, e como cocos Gram- positivos em culturas velhas, caracterizando um pleomorfismo e uma heterogeneidade característicos do gênero (Mongodin et al., 2006). É ubíquo no solo e

concentra espécies com capacidade de sobrevivência em condições de estresse, como baixa de nutrientes, mudanças drásticas de temperatura, ionização radiante, radicais de oxigênio e metais tóxicos. É frequentemente isolado em ambientes contendo condições ambientais adversas, como em grandes profundidades, ambientes contaminados com resíduos químicos, e radioatividade. Sua ocorrência também é muito comum em amostras glaciais (Mongodin et al., 2006).

Firmicutes

O filo *Firmicutes* compreende as classes *Clostridia*, *Mollicutes* e *Bacilli*, que são bactérias Gram- positivas com baixo conteúdo G+C (Garrity, Bell & Lilburn, 2003). Todos isolados do filo *Firmicutes* presentes na coleção da Mata Atlântica se distribuíram na classe *Bacilli*, nos gêneros *Paenibacillus*, *Bacillus* e *Staphylococcus*. Em relação ao gênero *Staphylococcus*, foi observada a ocorrência de *S. hominis* como vizinho filogenético mais próximo de um dos isolados da coleção, que representa uma espécie associada à microbiota anfibiônica humana (Carretto et al., 2005). Apesar de serem relatados casos de baixa resolução do rRNA 16S para esta espécie (Takahashi, Satoh & Kikuchi, 1999), também se deve considerar a possibilidade de contaminação da amostra durante a coleta ou o processamento do material. Entretanto, os outros gêneros deste filo são comumente associados ao solo, e já foram relatados no Brasil. Em associação com plantações de trigo, no Rio Grande do Sul, 311 micro-organismos fixadores de nitrogênio foram isolados, pertencentes aos gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus* (Beneduzi, et al., 2008). Souchie e colaboradores (2006) também já haviam observado a ocorrência de *Bacillus* no Brasil, entre bactérias solubilizadoras de fósforo, em um domínio secundário de Mata Atlântica, na região de Paraty.

Espécies de *Bacillus* possuem algumas características que facilitam sua sobrevivência no ambiente, incluindo a espessa parede celular, a capacidade de formação de endosporos resistentes, a secreção de antibióticos, enzimas e peptídeos de sinalização, além de ser observada uma ampla capacidade metabólica (Gardener, 2004). A capacidade de formação de endósporos já foi descrita como responsável pela

biogeografia do gênero *Bacillus* (Janssen, 2006). Os gêneros *Bacillus* e *Paenbacillus* podem ser encontrados na rizosfera de plantas, atuando como agentes de biocontrole, promotores de crescimento ou fixadores de nitrogênio (Powell & Jutsum, 1993). Entretanto, podem ser altamente perigosos e alguns são considerados potenciais agentes de bioterrorismo (Spencer, 2007).

5.3 Métodos dependentes e independentes de cultivo

Uma abrangente abordagem realizada por Floyd e colaboradores (2005) definiu quais eram os gêneros de bactérias cultiváveis que eram encontrados com maior frequência em associação com o ambiente terrestre. Os dados deste trabalho forneceram um panorama sobre a diversidade bacteriana cultivável descrita em solos obtidos de diferentes regiões geográficas. Com base na Coleção de Culturas Tipo Americana (ATCC), que é altamente representativa por concentrar 2/3 de todas as linhagens tipo de todo mundo, Floyd verificou a alocação filogenética das linhagens obtidas com maior frequência do ambiente terrestre e definiu os principais gêneros associados ao solo. Curiosamente, assim como observado entre os isolados da Mata Atlântica, praticamente todas as amostras avaliadas se distribuíam nos filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria*.

Apesar da maioria das bactérias cultiváveis do solo se distribuir somente nestes três filos, alguns estudos realizados através de metodologias independentes de cultivo mostram que estes não são necessariamente os grupos mais expressivos do solo (Janssen, 2006). Em uma análise semelhante à de Floyd, Janssen (2006), avaliou a composição geral das comunidades microbianas do solo por meio de metodologias independentes de cultivo, analisando um total de 32 bibliotecas de rRNA 16S preparadas a partir de sequências obtidas de uma grande variedade de solos. Seus resultados demonstraram que os filos mais comumente encontrados em associação com o solo são *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes*, e *Firmicutes*, que juntos, representam 92% de todas as bibliotecas analisadas. Em termos de representatividade, os filos mais freqüentemente encontrados entre as coleções de bactérias, apresentam participação variável nas bibliotecas e ocorrem nas seguintes

proporções: *Proteobacteria*, variando de 20 a 60%, *Firmicutes* pode ser observado em até 5% e *Actinobacteria*, em até 25% dos clones.

Rodrigues e colaboradores (dados não publicados) avaliaram a diversidade bacteriana de 2 das 8 amostras de solo utilizados neste estudo (pontos de coleta 1 e 2), através de metodologia independente de cultivo. Os resultados de Rodrigues e colaboradores relataram a ocorrência de 9 filos distintos, sendo que 36% da biblioteca do solo 2 apresentava sequências de bactérias que ainda não foram cultivadas, confrontando com os 3 recuperados através dos métodos dependentes de cultivo. Além das marcantes diferenças observadas em relação à quantidade de filos recuperada, diferenças qualitativas também foram observadas. As sequências de rRNA 16S dos clones obtidos se relacionavam taxonomicamente, considerando a proporção observada, aos filos *Acidobacteria* (40%), *Proteobacteria* (22%), *Verrucomicrobia* (9%), *Bacteroidetes* (2%) e *Actinobacteria* (2%). Entre os cultiváveis da Mata Atlântica, entretanto, a representatividade observada para os filos *Proteobacteria* e *Actinobacteria* foi maior que a observada entre os clones. Além disso, o filo *Firmicutes* não foi observado entre os clones de Rodrigues. Acredita-se que a baixa frequência de bactérias do filo *Firmicutes* nas metodologias independentes de cultivo possa ocorrer em função da dificuldade de extração de DNA das células e dos endósporos, que apresentam uma estrutura mais rígida do que a observada normalmente, e podem dificultar a lise bacteriana, apesar de ainda não existirem evidências concretas (Janssen, 2006).

Outros trabalhos na literatura corroboram o que foi observado na Mata Atlântica, demonstrando que os métodos independentes de cultivo são mais abrangentes (Vishnivetskaya et al., 2006). Entretanto, o cultivo de micro-organismos, particularmente daqueles que representam novos táxons, é fundamental para a descrição da biodiversidade associada a ele. As metodologias dependentes de cultivo, apesar de não serem tão representativas quanto as baseadas em moléculas de DNA, permitem a melhor compreensão do papel ecológico associado aos micro-organismos, são essenciais para a classificação taxonômica e, principalmente, para a descrição de processos metabólicos com alto potencial de aplicação biotecnológica, como é o caso do grupo funcional das bactérias lignocelulolíticas (Leisack et al., 1997). Sendo assim, a biodiversidade ainda é avaliada através dos métodos clássicos de cultivo, e, é cada vez mais notável a necessidade de concentrar esforços no desenvolvimento de condições

apropriadas de cultivo para recuperar a grande fração de micro-organismos, que até então, é classificada como não-cultivável (Janssen et al., 2002) e só está representada na forma de sequências de DNA.

5.4 Lignocelulose

Tradicionalmente, atribui-se a degradação da maior parte da matéria lignocelulolítica presente no solo aos fungos. Poucos trabalhos abordam o metabolismo de lignocelulose em bactérias, apesar de este sistema enzimático ser importante para o estabelecimento de diferentes tipos de relações com plantas (endofíticas e patogênicas) e para o aproveitamento energético da lignocelulose entre as bactérias. Os resultados obtidos neste trabalho, entretanto, demonstraram a ocorrência de muitos gêneros bacterianos capazes de degradar este composto.

Verificou-se que a maioria dos isolados obtidos na coleção da Mata Atlântica com atividade lignocelulolítica pertence ao filo *Proteobacteria*. Este panorama confirma o que já vinha sendo sugerido em outros trabalhos, que observaram associações de bactérias Gram- negativas (Suberkropp & Klug, 1976) ou de gêneros bacterianos do filo *Proteobacteria* (*Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Burkholderia*) (McNamara & Leff, 2004) a folhas em decomposição. Bactérias do filo *Actinobacteria* também já haviam sido relatadas em associação à folhas em decomposição (Suberkropp & Klug, 1976; Wohl & McArthur, 1998), corroborando os resultados obtidos, que também descreveram atividade lignocelulolítica para alguns gêneros deste filo.

A biodiversidade bacteriana associada à degradação de lignina e celulose, de maneira geral, é pouco explorada. Recentemente, da mesma maneira observada entre os isolados da coleção da Mata Atlântica, a capacidade de metabolismo da celulose foi descrita nos gêneros *Streptomyces*, *Kitasatospora*, *Arthrobacter*, *Paenibacillus*, *Variovorax*, *Burkholderia* e *Bacillus* (Ulrich, Klimke & Wirth, 2008). Além do que já havia sido demonstrado por estes autores, os resultados obtidos no presente trabalho também caracterizaram, com exceção de *Paenibacillus* e *Bacillus*, os demais gêneros com metabolismo de lignina associado. Além disso, foram identificados outros gêneros bacterianos capazes de metabolizar este composto, contribuindo desta maneira para a

elucidação de outros táxons bacterianos capazes de metabolizar a lignina. Apesar de já terem sido observadas bactérias com potencial de metabolização da lignina em outros estudos (Falcón et al., 1995), os resultados obtidos são inovadores, pois dados referentes à taxonomia destes micro-organismo, praticamente são inexistentes.

6 CONCLUSÕES

- Os solos obtidos da Mata Atlântica (PARNASO) apresentaram uma grande densidade de bactérias lignocelulolíticas cultiváveis, sendo obtidas contagens oscilando na faixa de 10^6 a 10^8 UFC/g.
- Atrelada à alta densidade microbiana, foi observada uma grande variabilidade taxonômica, sendo recuperados 77 morfotipos distintos distribuídos em 24 gêneros bacterianos.
- A maioria dos isolados obtidos pertence ao filo *Proteobacteria*, ocorrendo também bactérias dos filios *Firmicutes* e de *Actinobacteriam*, em menores proporções.
- A maioria dos isolados obtidos na coleção da Mata Atlântica, pertence aos gêneros *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter* e *Bacillus*, que também apresentaram ampla distribuição geográfica no PARNASO, sendo obtidos de pelo menos 4 solos contendo características edáficas distintas.
- Alguns isolados apresentam similaridade rRNA 16S menor ou igual a 98% com as espécies já conhecidas, sendo portanto possíveis espécies novas.
- A maioria das bactérias com capacidade de degradação da lignocelulose esteve relacionada ao filo *Proteobacteria*.
- O metabolismo da celulose foi mais comum entre os isolados do que o metabolismo da lignina, sendo observados 90% e 20% de isolados com estas atividades enzimáticas, respectivamente.

7 PERSPECTIVAS

Todos os grupos bacterianos encontrados na coleção foram alocados no espaço filogenético, com definição dos gêneros bacterianos em questão. Entretanto, a baixa resolução taxonômica associada ao sequenciamento do rRNA 16S é muito bem conhecida (Stackebrandt & Goebel, 1994), e bem descrita para muitos gêneros encontrados (Palmisano et al., 2001; Payne et al., 2005). O uso do sequenciamento do rRNA 16S não foi suficiente para a definição precisa das espécies bacterianas encontradas, como já era esperado. A fim de se refinar a caracterização taxonômica dos micro-organismos e definir precisamente as espécies em questão, é necessário que estudos complementares sejam realizados, por meio de uma abordagem polifásica (Colwell, 1970).

Os micro-organismos lignocelulolíticos são muito pesquisados por representarem um grupo funcional com potencial aplicação no mercado de bioetanol (Lin & Tanaka, 2006). Muitos esforços estão concentrados na obtenção de bactérias contendo alta atividade enzimática que possam ser empregadas em etapas de pré-tratamento de resíduos agroindustriais lignocelulolíticos pela liberação de açúcares simples a partir desta biomassa, e fermentação alcoólica dos açúcares gerados (Kumar, Singh & Singh, 2008). Dentre as estratégias mais utilizadas, a clonagem de genes codificadores de enzimas com alta atividade em vetores de expressão é a mais comum (Wulff, Carrer & Pascholati, 2006), entretanto, a possibilidade de emprego de micro-organismos lignocelulolíticos obtidos diretamente do ambiente é real (Lynd et al., 2002) e mais atrativa, pois elimina as etapas de clonagem e expressão, que em muitos casos podem ser complicadas.

Foram obtidos muitos gêneros bacterianos caracterizados como lignocelulolíticos, com base na capacidade de metabolismo de substâncias sintéticas. Apesar de estes isolados terem demonstrado atividades enzimáticas específicas, a degradação da biomassa lignocelulolítica *in situ* é muito mais complexa, dependendo da ação sinérgica de um complexo enzimático que envolve outras enzimas além da celulase (endoglucanase) e da ligninase (Lynd et al., 2002; Mansfield & Meder, 2003). Além de existirem bactérias

com capacidade de degradar a celulose cristalina, outras bactérias podem apresentar um sistema celulolítico incompleto (Rabinovich, Melnik & Bolobova, 2002), o que pode ser o caso das bactérias obtidas nesta coleção. No ambiente, normalmente este processo é realizado pela ação conjunta de um consórcio microbiano, que inclui fungos e bactérias (Madigan, Martinko & Parker, 1996; Boer et al., 2005). Portanto, apesar de se ter indícios que estes micro-organismos possuem potencial de degradação de lignocelulose, estudos complementares serão necessários, a fim de se avaliar a real viabilidade de emprego destes micro-organismos para a degradação *in situ* da biomassa presente em resíduos de plantas, como cana-de-açúcar, a fim de que possam ser utilizados como substrato industrial para a produção de bioetanol.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aristidou, A. & Pentillä, M.. 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology*. 11: 187-198.
- Bardgett, R.D., Mawdsley, J.L., Edwards, S., Hobbs, P.J., Rodwell, J.S. & Davies, W.J.. 1999. Plant species and nitrogen effects on soil biological properties of temperate upland grasslands. *Functional Ecology*. 13: 650–660.
- Bayer, E.A., Chanzyt, H., Lamedo, R. & Shoham, Y.. 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*. 8: 548-557.
- Béguin, P. & Aubert, J.P.. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiological Reviews*. 13: 25-58.
- Beneduzi, A., Peres, D., da Costa, P.B., Zanettini, M.H.B., Passaglia, L.M.P.. 2008. Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. *Research in Microbiology*. 159: 244 -250.
- Bergey, D.H. & Breed, R.S.. 1957. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7a Edição. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Bergey, D.H., Bunchanan, R.E. & Gibbons, N.E.. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8a Edição. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Boer, W., Folman, L.B., Summerbell, R.C., Boddy, L.. 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*. 29: 795–811.
- Braidy, N.C. & Weil, R.R.. 1996. *The Nature and properties of soils*. 11^a Edição. Prentice Hall.
- Brenner, D.J., Staley, J. & Krieg, N.. 2005. *The Proteobacteria*. Poliphasic Taxonomy. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2a Edição, Parte A: 2: 43-48. New York: Springer-Verlag.
- Bull, A.T. & Slater, J.H.. 1982. *Microbial Interactions and Communities*. Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Caballero-Mellado, J., Onofre-Lemus, J., Estrada-de los Santos, P. & Martínez-Aguilar, L.. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 5308–5319.

- Cao, Y. & Tan, H.. 2002. Effects of cellulase on the modification of cellulose. *Carbohydrate Research*. 337: 1291–1296.
- Carretto, E., Barbarini, D., Couto, I., Vitis, D., Marone, P., Verhoef, J., Lencastre, H. & Brisse, S.. 2005. Identification of coagulase-negative staphylococci other than *Staphylococcus epidermidis* by automated ribotyping. *Clinical Microbiology & Infection*. 11(3): 177- 184.
- Cheng, H.P. & Lessie, T.G.. 1994. Multiple replicons constituting the genome of *Pseudomonas cepacia* 17616. *Journal of Bacteriology*. 176: 4034–4042.
- Coenye, T., & Vandamme, P.. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*. 5:719–729.
- Colwell, R.R.. 1970. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *Journal of Bacteriology*. 104: 410–433.
- Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clément, C. & Barka, E.A.. 2008. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiology Reviews*. 32: 607–626.
- [Cunha, A.C.; Grelle, C.E.V.; Boubli, J.P.](#). 2007. [Pesquisa e conservação dos Muriquis no estado do Rio de Janeiro, com ênfase no Parque Nacional da Serra dos Órgãos e entorno](#). Comunicação oral realizada no V Encontro de Pesquisadores do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, realizado na Sede Teresópolis do PARNASO.
- Davelos, A.L., Kinkel, L.L., Samac, D.A.. 2004. Spatial variation in frequency and intensity of antibiotic interactions among *Streptomyces* from prairie soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 1051–1058.
- Embley, T. M. & E. Stackebrandt. 1994. The molecular phylogeny systematics of the actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology*. 48: 257–289.
- Embrapa Solos. 1999. Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes – 1ª Edição. Rio de Janeiro.
- Estrada-de-Los-Santos, P., Bustillos-Cristales, R. & Caballero-Mellado, J.. 2001. *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (6): 2790–2798.
- [Euzéby, J.P.](#). 2008. [List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature](#) Copyright © 1997-2009. (<http://www.bacterio.net>).

- Falcón, M.A., Rodríguez, A., Carnicero, A., Regalado, V., Perestelo, F., Milstein, O. & de la Fuente, G.. 1995. Isolation of microorganisms with lignin transformation potential from soil of Tenerife Island. *Soil Biological Biochemistry*. 27(2): 121-126.
- Felsenstein J.. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.
- Floyd, M.M., Tang, T., Kane, M. & Emerson, D.. 2005. Captured Diversity in a Culture Collection: Case Study of the Geographic and Habitat Distributions of Environmental Isolates Held at the American Type Culture Collection. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(6): 2813–2823.
- Fox, G.E., Pechman, K.R. & Woese, C.R.. 1977. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. *International Journal of Systematics Bacteriology*. 27: 44–57.
- Frostegard, A., Courtois S., Ramisse, V., Clerc, D. S., Bernillon, F. L. G., Jeannin, P., Nesme, X. & Simonet, P.. 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 5409– 5420.
- Gardener, B.B.M.. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*. 94: 1252–1258.
- Garrity, G.M., Bell, J.A. & Lilburn, T.G.. 2003. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2^a Edição. Release 4.0 DOI 10.1007/bergeysoutline200310.
- Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F.L., Swings, J.. 2005. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews: Microbiology*. 3(9): 733-739.
- Grohmann, E., Muth, G. & Espinosa, M. 2003. Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 67(2): 277–301.
- Groth, I., Rodríguez, C., Schütze, B. Schmitz, P., Leistner, E., & Goodfellow, M.. 2004. Five novel *Kitasatospora* species from soil: *Kitasatospora arboriphila* sp. nov., *K. gansuensis* sp. nov., *K. nipponensis* sp. nov., *K. paranensis* sp. nov. and *K. terrestris* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 2121–2129.
- Hamelinck, C.N., van Hooijdonk, G. & Faaij, A.P.C.. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*. 28: 384–410.

- Han, S.J., Yoo, Y.J. & Kang, H.S.. 1995. Characterization of a Bifunctional Cellulase and Its Structural Gene: The *cel* gene of *Bacillus* sp. D04 has exo- and endoglucanase activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 270 (43): 26012–26019.
- Handelsman, J.. 2004. *Microbial Diversity and Bioprospectig – Soil- The Metagenomics Approach*. Edited by Alan T.Bull. ASM Press, Washington, D.C..
- Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. & Straalen, M.N.. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*. 11: 296–310.
- Holden, M.T.G., Titball, R.W., Peacock, S.J. et al.. 2004. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *PNAS*. 101: 14240–14245.
- Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M. & Sait, M.. 2002. Improved Culturability of Soil Bacteria and Isolation in Pure Culture of Novel Members of the Divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(5): 2391–2396.
- Janssen, P.H.. 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(3): 1719–1728.
- Kato, S., Haruta, S., Cui, Z. J., Ishii, M., Yokota, A. & Igarashi, Y.. 2004. *Clostridium Straminisolvens* sp. nov., a moderately thermophilic, aerotolerant and cellulolytic bacterium isolated from a cellulose-degrading bacterial community. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2043–2047.
- Kim, S.J., Lee, C.M., Han, B.R., Kim, M.Y., Yeo, Y.S., Yoon, S.H., Koo, B.S. & Jun, H.K.. 2008. Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 282: 44–51.
- Konstantinidis, K.T., Ramette, A. & Tiedje, J.M.. 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philosophic Transactions of the Royal Society*. 361:1929–1940.
- Kumar, R., Singh, S. & Singh, O.V.. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35: 377–391.
- Ladd, J.N., Foster, R.C., Nannipieri, P. & Oades, J.M.. 1996. Soil structure and biological activity. *Soil Biochemistry*. 9:23–78.
- Lambais, M.R., Crowley, D.E., Cury, J.C., Büll, R.C., Rodrigues, R.R.. 2006. Bacterial Diversity in Tree Canopies of the Atlantic Forest. *Science* 312: 1917.

- Lane, D.L., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L. & Pace, N.R.. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academic of Science*. 82: 6955–6959.
- Lee, Jeewon.. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Review. Journal of Biotechnology*. 56: 1-24.
- Lehr, N.A., Schrey, S.D., Hampp, R., Tarkka, M.T.. 2008. Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. *New Phytology*. 177: 965–976.
- Leisack, W., Jessen, P.H., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N. & Stackebrandt, E.. 1997. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. Em: vanElsas, J.D., Trevors J.T., Wellington, E.M.H. (Eds). *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker Inc., New York NY.
- Lessie, T. G., Hendrickson, W., Manning, B.D. & Devereux, R.. 1996. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Microbiology Letters*. 144: 117–128.
- Lima-Bittencourt.C.I., Astolfi-Filho, S., Chartone-Souza, E., Santos, F.R. & Nascimento, A.M.A.. 2007. Analysis of *Chromobacterium* sp. natural isolates from different Brazilian ecosystems. *BMC Microbiology*. 7: 58- 66.
- Lin, Y & Tanaka, S.. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied and Microbiological Biotechnology*. 69: 627–642.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl,W.H. & Pretorius, I.S.. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66 (3): 506-577.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J.. 1996. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, ed. 8.
- [Mallet-Rodrigues, F.](#) 2007. [Aves da Serra dos Órgãos, estado do Rio de Janeiro](#). Comunicação oral realizada no V Encontro de Pesquisadores do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, realizado na Sede Teresópolis do PARNASO.
- Mansfield, S.D. & Meder, R..2003. Cellulose hydrolysis – the role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation. *Cellulose*. 10: 159–169.
- McInerney, J.O., Cotton, J.A. & Pisani, D.. 2008. The prokaryotic tree of life: past, present... and future. *Trends in Ecology and Evolution*. 23(5): 276-281.
- McNamara, C. J. & Leff, L.G.. 2004. Response of Biofilm Bacteria to Dissolved Organic Matter from Decomposing Maple Leaves. *Microbial Ecology*. 48: 324-330.

- Medau, R.. 2007. Diversidade de bactérias *Burkholderia* em solo de Terra Preta Arqueológica da Amazônia por análise em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) e sequenciamento. Tese de Mestrado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo.
- Mongodin, E.F., Shapir, N., Daugherty, S.C., DeBoy, R.T., Emerson, J.B., Shvartzbeyn, A., Radune, D., Vamathevan, J., Riggs, F., Grinberg, V., Khouri, H., Wackett, L.P., Nelson, K.E. & Sadowsky, M.J.. 2006. Secrets of Soil Survival Revealed by the Genome Sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. *Plos Genetic*. 2 (12): 2094-2106.
- [-Monteiro, R., Macedo, M., Flinte, V., Grenha, V., Kaplan, D., Vianna, J., Martins, C., Gomes, C.V., Freitas, S., Araújo, C., Araújo, R. & Hentz, E.. 2007. Ecologia de insetos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos. Comunicação oral realizada no V Encontro de Pesquisadores do Parque Nacional da Serra dos Órgãos realizado na Sede Teresópolis do PARNASO.](#)
- Moreira, I. 1999. O espaço geográfico: Geografia Geral e do Brasil. Os ecossistemas ameaçados e a questão ambiental no Brasil. 43ª Edição. Editora Ática.
- [-Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A., Kent J.. 2000. Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities. Nature. 403 :853-858.](#)
- Norkrans, B. 1967. Cellulose and cellulolysis. *Applied Microbiology*. 9: 91-130.
- Oliveira, A.M., Silva, D.H.A., Boschiglia, D.R., Torres, E.J.L., Adnet, F.A.O., Peralta, J., Silva, T.B., Moutinho, V.A.C., Sant'anna, V. & Lanfredi, R.M.. 2008. [Helmintofauna de animais silvestres do Parque Nacional da Serra dos Órgãos](#). Comunicação oral realizada no VI Encontro de Pesquisadores do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, realizado na Sede Teresópolis do PARNASO.
- Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J., & Olsen, G.J.. 1985. Analysing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM News*. 51: 4-12.
- Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J.. 1986. The analysis of microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbial Ecology*. 9:1-55.
- Palmisano, M.M., Nakamura, L.K., Duncan, K.E., Istock, C.A., & Cohan, F.M.. 2001. *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 1671–1679.
- Papi, B.S., Loretto, D. & Vieira, M.V.. 2008. [Uso do Espaço pelo Marsupial *Caluromys philander* \(Linnaeus, 1758\) através do Método dos Ninhos Artificiais](#)

[\(Didelphimorphia; Didelphidae\)](#). Comunicação oral realizada no VI Encontro de Pesquisadores do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, realizado na sede Teresópolis do PARNASO.

-Parke, J. L., & Gurian-Sherman., D.. 2001. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. Annual Reviews of Phytopathology. 39: 225–258.

-Paul, E.A. & Clark, F.E.. 1996. Soil Microbiology and Biochemistry. 2ª Edição Academic Press, New York, N.Y.

-[Payne, G.W.](#), [Vandamme P.](#), [Morgan S.H.](#), [Lipuma, J.J.](#), [Coenye T.](#), [Weightman, A.J.](#), [Jones, T.H.](#), [Mahenthiralingam, E.](#). 2005. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. [Applied and Environmental Microbiology](#). 71(7):3917-3927.

-Pitcher, D.G., Saunders, N.A. & Owen, R.J.. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Letters in Applied Microbiology. 8 (4): 151-156.

-Powell, K.A. & Jutsum, A.R.. 1993. Technical and commercial aspects of biological control products. Pesticide Science. 37: 315–321.

-Priest, F. & Austin, B.. 1993 Modern Bacterial Taxonomy. 2a Edição. Chapman & Hall.

-Rabinovich, M.L., Melnik, M.S. & Bolobova, A.V. 2002. Microbial cellulases. Applied and Biochemical Microbiology. Review. 38: 305–321.

-Rodrigues, T.B., Kruger, R.H., Vicente, A.C.P., Coelho, A.M.A. & Thompson, F.L. Bacterial. Diversity of the Brazilian Atlantic Forest Soils. Dados não publicados.

-[Saitou, N.](#) & [Nei, M.](#) 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4 (4): 406-25.

-Schubert, C. 2006.. Can biofuels finally take center stage? Nature Biotechnology. 24 (7): 777- 784.

-Semedo, L.T., Linhares, A.A., Gomes, R.C., Manfio, G.P., Alviano, C.S., Linhares, L.F. & Coelho, R.R.. 2001. Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. Microbiological Research. 155(4): 291- 299.

-Semedo, L.T., Gomes, R.C., Linhares, A.A., Duarte, G.F., Nascimento, R.P., Rosado, A.S., Margis-Pinheiro, M., Margis, R., Silva, K.R., Alviano, C.S., Manfio, G.P., Soares, R.M., Linhares L.F. & Coelho R.R.. 2004. *Streptomyces drozdowiczii* sp. nov., a novel

cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54 (4): 1323-1328.

-Service, R.F.. 2007. Cellulosic Ethanol. *Biofuel Researchers Prepare To Reap a New Harvest*. *Science*. 315: 1488- 1491.

-Skerman, V.B.D., McGowan, V. & Sneath, P.H.A.. 1980. Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 30: 225-420.

-Sneath, P.H.A. & R.R. Sokal. 1973. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. San Francisco, W.H. Freeman.

-Souchie, E.L., Saggin-Júnior, O.J., Silva, E.M.R., Campello, E.F.C., Azcón, R. & Barea, J.M.. 2006. Communities of P-Solubilizing Bacteria, Fungi and Arbuscular Mycorrhizal Fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ – Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 78(1): 183-193.

-Spencer, R.C.. 2007. Potential bio-terror agents. *Journal of Hospital Infection*. 65 (S2): 19–22.

-Stackebrandt, E. & Goebel, B.M.. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44 (4): 846-849.

-Streit, W.R., & Schmitz, R.A.. 2004. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology*.7: 492-498.

-Suberkropp, K. & Klug, M.J.. 1976. Fungi and bacteria associated with leaves during processing in a woodland stream. *Ecology*. 57: 707–719.

-Takahashi, T., Satoh, I. & Kikuchi, N.. 1999. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16s rRNA gene sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49: 725-728.

-Tamura, K., Dudley J., Nei, M. & Kumar, S.. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.

-Teather, R.M. & Wood, P.J.. 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 43: 777–780.

-Terra, E. R. & Araujo, F.V.. 2007. Avaliação Microbiológica das águas da Travessia Petrópolis – Teresópolis (Parque Nacional da Serra dos Órgãos, RJ). Comunicação oral

realizada no V Encontro de Pesquisadores do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, realizado na Sede Teresópolis do PARNASO.

-Thompson, F.L., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Swings, J.. 2001. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Systematic and Applied Microbiology*. 24(4): 520- 528.

-[Thompson, J.D.](#), [Higgins, D.G.](#) & [Gibson, T.J.](#). 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. [Nucleic Acids Research](#). 22 (22): 4673- 4680.

-Tisdall, J.M. & Oades, J.M.. 1982. Organic matter and water stable aggregates in soils. *Journal of Soil Science*. 33: 141–163.

-Torsvik, V. & Ovreàs, L.. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. 5: 240–245.

-Ulrich, A., Klimke, G. & Wirth, S.. 2008. Diversity and Activity of Cellulose-Decomposing Bacteria, Isolated from a Sandy and a Loamy Soil after Long-Term Manure Application. *Microbial Ecology*. 55: 512- 522.

-Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. & Swings, J.. 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiological Reviews*. 60 (2): 407–438.

-Vardavakis, E. 1989. Seasonal fluctuations of aerobic cellulolytic bacteria, and cellulase and respiratory activities in a soil profile under a forest. *Plant and Soil*. 115: 145–150.

-Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F. & van Sinderen, D.. 2007. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 71(3): 495-548.

-Vishnivetskaya, T.A., Petrova, M.A., Urbance, J., Ponder, M., Moyer, C.L., Gilichinsky, D.A.& Tiedje, J.M.. 2006. Bacterial Community in Ancient Siberian Permafrost as Characterized by Culture and Culture-Independent Methods. *Astrobiology*. 6 (3): 400- 414.

-von Wintzingerode, F., Goebel, U. B & Stackebrandt, E.. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR based rRNA analysis. *FEMS Microbiological Reviews*. 21: 213– 229.

- Wardle, D.A., Bardgett, R.D., Klironomos, J.N., Setälä, H., Putten, W.H. & Wall, D.H.. 2004. Ecological Linkages Between Aboveground and Belowground Biota. Review. Science. 304: 1629-1633.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, P., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. & Trüper, H. G.. 1987. Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. International Journal of Systematic Bacteriology. 37: 63–464.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B., Thomashow, L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annual Review of Phytopathology. 40: 309–348.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C. & Wiebe, W.J. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. PNAS. 95: 6578–6583.
- Wohl, D.L. & McArthur, J.V.. 1998. Actinomycete-flora associated with submersed freshwater macrophytes. FEMS Microbiology Ecology. 26:135- 140.
- Wood, P.J.. 1980. Specify in the interactions of direct dyes with polysaccharides. Carbohydrate Research. 85 (2): 271-287.
- Wulff, N.A., Carrer, H. & Pascholati, S.F.. 2006. Expression and Purification of Cellulase Xf818 from *Xylella fastidiosa* in *Escherichia coli*. Current Microbiology. 53: 198 –203.
- Xu, L., Li, Q. & Jiang, C.. 1996. Diversity of Soil Actinomycetes in Yunnan, China. Applied and Environmental Microbiology. 62 (1): 244–248.
- Yap, W.H., Zhang, Z. & Wang, Y.. 1999. Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon. Journal of Bacteriology. 181: 5201–5209.
- Yeon, S.H., Jeong, W.J. & Park, J.S.. 2005. The Diversity of Culturable Organotrophic Bacteria from Local Solar Salterns. The Journal of Microbiology. 43 (1): 1-10.
- Zhou, J., Guo, W., Wang R., Han, X. & Wang, Q.. 2008. Microbial community diversity in the profile of an agricultural soil in northern China. Journal of Environmental Sciences. 20: 981 –988.
- (<http://www.ibama.gov.br>). Material capturado da Internet, no dia 29 de setembro de 2007.
- (<http://www.rbma.org.br/anuario>). Material capturado da Internet, no dia 29 de setembro de 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)