

## **Isolamento, caracterização e identificação de bactérias xilanolíticas de uma área de manguezal**

Kelly Jaqueline Alves<sup>\*(1)</sup>, Mylène Calciolari Pinheiro da Silva <sup>(1)</sup>, Fernando Dini Andreote<sup>\*(1)</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciência do Solo, Laboratório de Microbiologia do Solo, Universidade de São Paulo.  
Avenida Pádua Dias, 11 CP 09, Piracicaba, SP 13418-900, Brasil

\*Autor para correspondência: [kelly.jaqueline.alves@hotmail.com](mailto:kelly.jaqueline.alves@hotmail.com) (K. J. Alves), [fdandreo@gmail.com](mailto:fdandreo@gmail.com) (F. D. Andreote)

1 **Resumo** O manguezal é considerado um bioma costeiro tropical caracterizado pela inundação periódica das  
2 marés, o que confere a este ambiente características únicas e específicas. Possui grande quantidade de material  
3 lignocelulósico composto principalmente pela celulose, hemicelulose e lignina. Os micro-organismos  
4 xilanolíticos são responsáveis por degradar a hemicelulose, composta pelo polissacarídeo xilana, em xilo-  
5 oligossacarídeos que podem ser utilizados em diversos setores industriais. Neste contexto, o presente trabalho  
6 teve por objetivo o isolamento, a caracterização e a identificação de bactérias xilanolíticas provenientes de uma  
7 área de manguezal, impactada com derramamento de petróleo, localizada no município de Bertioga, São Paulo.  
8 Ao todo foram obtidas 44 estirpes potencialmente xilanolíticas, assim caracterizadas com base em suas  
9 atividades enzimáticas. Por meio do método qualitativo *cup plate* foi possível identificar que dos 44 isolados 43  
10 demonstraram halo de degradação indicando atividade da enzima xilanase com índices enzimáticos (IE) variando  
11 entre 0 e 10,9. A estirpe bacteriana 11 (*Bacillus megaterium*) foi a que se destacou das demais por ter  
12 apresentado o maior IE (10,9). Quando submetidas ao teste quantitativo por meio do método colorimétrico com  
13 ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), o isolado 39 (*Bacillus stratosphericus*) se destacou produzindo uma atividade  
14 enzimática de 0,43 U/mL. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA das estirpes permitiu a caracterização  
15 de dois grupos genotípicos: *Bacillus* e *Paenibacillus*. De maneira geral, os isolados obtidos demonstram serem  
16 promissores produtores de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico, podendo estas enzimas  
17 apresentarem características particulares devido a sua evolução dentro das condições únicas encontradas nos  
18 solos de manguezais.

19  
20 **Palavras-chave:** Bactéria, Xilanase, Potencial biotecnológico e 16S RNAr

21  
22 **Abstract** The mangrove is considered a tropical coastal biome characterized by periodic flooding of the tides.  
23 This environment has unique and specific characteristics. This ecosystem has a large amount of lignocellulosic  
24 material mainly composed of cellulose, hemicellulose and lignin. The xylanases degrade hemicellulose into  
25 xylooligosaccharides that can be used in various industrial sectors. In this context, this study aimed to isolation,  
26 characterization and identification of xylanolytic bacteria from a mangrove area, impacted by the oil spill, in the  
27 city of Bertioga, São Paulo. We obtained 44 potentially xylanolytic bacteria, and after that, we held up the  
28 enzymatic activity tests. Through the qualitative method *cup plate* was identified that 43 of the 44 isolates  
29 demonstrated degradation halo indicating activity of the xylanase enzyme, with enzyme index (IE) ranging from  
30 0 to 10.9. The bacterial strain 11 (*Bacillus megaterium*) was the one that stood out from the others because it  
31 presented the highest IE (10.9). When the isolates were subjected to quantitative test by colorimetric method  
32 with 3,5-dinitrosalicílico (DNS), the 39 (*Bacillus stratosphericus*) stood producing an enzyme activity of 0.43  
33 U/mL. The partial 16S rRNA gene sequencing of the strains allowed the characterization of two genotypic  
34 groups: *Bacillus* and *Paenibacillus*. In general, isolates were obtained demonstrate promising producing  
35 extracellular enzymes industrial and biotechnological interest, can present particular characteristics of these  
36 enzymes due to their evolution into the unique conditions found in mangrove soils.

37  
38 **Key words:** Bacteria, Xylanase, Biotechnological potential and 16S RNAr.

40	<b>Abreviações</b>
41	
42	<b>BOD:</b> Câmara de crescimento
43	<b>DC:</b> Diâmetro médio da colônia
44	<b>DH:</b> Diâmetro médio do halo de degradação
45	<b>DNS:</b> Ácido 3,5-dinitrosalicílico
46	<b>IE:</b> Índice Enzimático
47	<b>LB:</b> Lúria Bertani
48	<b>MMX:</b> Meio Mínimo com Xilana
49	<b>U:</b> Unidade de Enzima
50	
51	
52	
53	
54	
55	
56	
57	
58	
59	
60	
61	
62	
63	
64	
65	
66	
67	
68	
69	
70	
71	
72	
73	
74	
75	
76	
77	
78	

## 79 **Introdução**

80 Os manguezais estão localizados em regiões tipicamente inundadas pelas marés tais como: estuários, lagoas  
81 costeiras, margens de baías, barras e enseadas. Este ecossistema é caracterizado pela mistura de águas doces e  
82 salgadas, solos anaeróbios/aeróbios e uma salinidade que varia de 4 e 30% (Zahran 1997; Schaeffer-Novelli et  
83 al. 2000). Apresentam condições ambientais bastante peculiares e estão constantemente expostos a variações,  
84 principalmente devido ao regime de marés da região onde se encontram.

85 A microbiota que compõe este ambiente está adaptada a estas condições consideradas inóspitas e  
86 extremas a outros organismos. A população bacteriana presente nos manguezais é mais abundante do que a de  
87 fungos, sendo possível sugerir que sua atividade metabólica exerça uma grande influência nos ciclos  
88 biogeoquímicos deste ambiente. Alguns gêneros encontrados nos manguezais e suas respectivas funções são:  
89 *Desulfovibrio* (redutoras de sulfato), *Azospirillum* (fixadoras de nitrogênio) e *Bacillus* (solubilizadoras de  
90 fosfato) (Kathiresan and Qasim 2005). A comunidade bacteriana desenvolve um papel essencial na ciclagem dos  
91 nutrientes, atuando de forma importante na degradação da matéria orgânica e ciclagem de seus componentes,  
92 como carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo (Alongi et al. 1993).

93 O material lignocelulósico presente nos manguezais é composto em sua maior parte pelos polímeros  
94 celulose, hemicelulose e lignina. A hemicelulose é um polissacarídeo heterogêneo, e por isso, se difere da  
95 celulose que possui apenas unidades de D-glicose. As unidades de açúcares da hemicelulose são compostas por  
96 pentoses (D-xilose, L-arabinose e L-ramnose), hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose) e ácidos urônicos  
97 (ácidos 4-O-metil-D-glucurônico) (Canetti 2004). O principal carboidrato que compõe a hemicelulose é a  
98 xilana. Sua estrutura em geral possui uma cadeia linear composta por unidades de D-xilose unida por ligações  
99 glicosídicas  $\beta$ - 1,4. De acordo com as ramificações encontradas no esqueleto da xilana, esta pode ser  
100 denominada homoxilana, arabinoxilana, glicuronoxilana ou glicuronoarabinoxilana (Shallom and Shoham  
101 2003).

102 Devido à complexidade molecular, a quebra total da xilana requer a ação de um complexo  
103 multienzimático, composto por endo e exoenzimas (Kalogeris et al. 2001). A endo-1,4- $\beta$ -xilânase, também  
104 conhecida como xilânase, é uma enzima responsável por transformar a xilana em xilo-oligossacarídeos,  
105 moléculas de baixo grau de polimerização passíveis de serem utilizadas para geração de produtos com valor  
106 agregado (Polizeli et al. 2005). A xilânase e seus produtos podem ser utilizados em diferentes setores industriais,  
107 como: produção de bioetanol (de Vries and Visser 2001), ração animal (Damiano et al. 2003), indústrias de  
108 papel (Tan et al. 2008), biobranqueamento (Valss and Roncero 2009; Birijlall et al. 2011), clareamento de sucos  
109 e cervejas (Biely 1985), bioenergia (Chiranjeevi et al. 2012) e produção de pães (Beg et al. 2001).

110 A utilização de enzimas microbianas é mais vantajosa em relação às obtidas de fontes vegetais e  
111 animais devido a sua maior disponibilidade, maior especificidade, menor custo de produção, estabilidade  
112 estrutural e fácil manipulação genética (Poorna and Prema 2006). São de grande interesse pelo fato de não  
113 gerarem resíduos tóxicos, preservando o meio ambiente e reduzindo os custos dos processos industriais (Said  
114 and Pietro 2002; Nascimento et al. 2007). A demanda por novas enzimas com características especiais como alta  
115 termoestabilidade e a tolerância a diferentes concentrações de salinidade é requerida em alguns processos  
116 industriais (Ventosa et al. 1998; Hough and Danson 1999; Jiang 2008). O estudo de novos isolados microbianos  
117 que produzam enzimas com estas características é de extrema importância. Ambientes como os manguezais

118 podem representar uma fonte promissora e inexplorada para o rastreamento de biocatalizadores microbianos  
119 com este potencial biotecnológico, devido suas características ambientais.

120 Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo isolar, caracterizar e identificar bactérias  
121 envolvidas na degradação da hemicelulose (xilana), a partir de amostras de solo de manguezal altamente  
122 impactado por um derramamento de petróleo. Os objetivos específicos visam: obtenção de isolados bacterianos  
123 com atividade xilanolítica a partir de amostra de solo de manguezal; determinação da atividade enzimática em  
124 meio de cultivo específico com xilana como substrato e posterior observação de halos de degradação; avaliação  
125 da atividade enzimática pelo método de açúcares redutores; identificação dos isolados obtidos por meio do  
126 sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

127

## 128 **Materiais e métodos**

129

### 130 Amostragem

131

132 O manguezal onde foi realizada a amostragem do solo está localizado no município de Bertioga, no Estado de  
133 São Paulo. Este ambiente sofreu um impacto causado por um derramamento de aproximadamente 35 milhões de  
134 litros de petróleo no ano de 1983 e as consequências da contaminação continuam presentes (Andreote et al.  
135 2012). A área de amostragem foi georreferenciada com o auxílio de um GPS (Sistema de Posicionamento  
136 Global) e possui a seguinte coordenada central: latitude 23°53'49''S e longitude 46°12'28''W. A amostragem  
137 foi realizada em novembro de 2010. Foram coletadas amostras em três pontos diferentes, em triplicatas, de uma  
138 profundidade de 30 cm da superfície do solo. Alíquotas de 50 g de cada uma das amostras foram agrupadas para  
139 compor uma amostra composta. Esta foi homogeneizada e posteriormente utilizada para o isolamento das  
140 bactérias.

141

### 142 Isolamento e purificação das bactérias

143

144 Para o isolamento das bactérias, 10 g da amostra composta foram adicionados em 90 mL de solução salina  
145 esterilizada (NaCl, 0,85%) em frascos Erlemeyers devidamente tampados, os quais foram agitados a 300 rpm  
146 durante 30 minutos. Procedeu-se então as diluições seriadas de fator 10 da suspensão bacteriana. Alíquotas de  
147 0,1 mL das diluições  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultura mínimo de sais  
148 com adição de xilana de beechwood da Sigma (MMX) como única fonte de carbono (g/L): extrato de levedura  
149 0,5; nitrato de sódio 0,5; fosfato de potássio 1,0; sulfato de ferro 0,01; xilana beechwood da Sigma 2,0 ; ágar 15;  
150 pH 7,0. As placas foram encubadas em câmaras de crescimento (BOD) à temperatura de 28°C por 48 horas. As  
151 colônias obtidas foram selecionadas aleatoriamente e novamente estriadas em placas de Petri contendo o meio  
152 de cultura mínimo de sais com adição de xilana de beechwood da Sigma (MMX) para a sua purificação. Antes  
153 dos isolados serem armazenados foi realizado um teste de confirmação da atividade xilanolítica por meio da  
154 identificação de halos de degradação ao redor da colônia pura, sendo estes evidenciados com a adição de uma  
155 solução de iodo (Kasana et al. 2008). As colônias puras foram armazenadas em meio Luria Bertani (LB) líquido

156 (g/L): triptona 10; extrato de levedura 5; NaCl 5; pH 7.0 com glicerol 50% (1:1) à -20°C (Sambrook and Russel  
157 2001).

158

159 Determinação do potencial enzimático- método qualitativo

160

161 Para a determinação qualitativa do potencial enzimático das bactérias isoladas foi utilizado o método *cup plate*  
162 (Dingle et al. 1953). Inicialmente os isolados foram reativados em meio Lúria Bertani (LB) sólido e mantidos  
163 em câmara de crescimento (BOD) a 28°C por 48 horas. Com o auxílio de um palito estéril, as bactérias foram  
164 repicadas, em triplicatas, nas placas contendo o meio mínimo com xilana beechwood da Sigma (MMX). As  
165 placas foram incubadas em câmara de crescimento (BOD) a 28°C por 72 horas e após este período, a atividade  
166 da enzima xilanase foi confirmada por meio da presença de zonas claras indicando halos de hidrólise ao redor  
167 das colônias. O halo de degradação foi evidenciado pela adição de solução de iodo a (2,0 g de KI e 1,0 g de iodo  
168 em 300 ml de água destilada) e posterior lavagem das placas com NaCl 5M (Kasana et al. 2008). Foi utilizado  
169 como controle positivo do meio de cultivo o fungo *Aspergillus sp* e como controle negativo a bactéria  
170 *Escherichia coli*. A atividade xilanólítica foi expressa pelo índice enzimático (IE), determinado pela razão entre  
171 o diâmetro médio do halo de degradação (dh) e o diâmetro médio da colônia (dc) (Sharma et al. 2002). As  
172 medidas foram mensuradas com o auxílio de uma régua milimetrada e expressas em centímetros. Os maiores  
173 índices representaram a maior atividade (Stamford et al. 1998).

174

175 Determinação do potencial enzimático- método quantitativo

176

177 Para a determinação quantitativa do potencial enzimático das estirpes foi utilizado o método colorimétrico ácido  
178 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller et al. 1959). Este mensura a liberação de açúcares redutores resultantes da  
179 atividade enzimática. Os isolados foram cultivados, em triplicatas, durante 4 dias em frascos Erlemeyers  
180 contendo 15 ml de meio de cultura mínimo de sais com adição de xilana de beechwood da Sigma (MMX)  
181 líquido, sob agitação de 150 rpm a 28°C. Após este período, 2 mL de cada amostra foi centrifugada a 13.000  
182 rpm por 20 minutos a 4°C. Uma alíquota de 50 µL do sobrenadante foi retirada para ser utilizado no teste  
183 enzimático (Samanta et al. 2011). O teste foi conduzido adicionando 50µL da enzima bruta em 450 µL de uma  
184 solução de 1% de xilana de beechwood (Sigma) em tampão fosfato de sódio (100 mM). Essa mistura foi  
185 incubada por 15 minutos a 50°C em banho-maria e a reação foi interrompida com a adição de 1 ml do reagente  
186 ácido 3,5-dinitrosalicílico. Após esse processo, as amostras foram mantidas por 5 minutos em banho-maria  
187 fervente, resfriadas a temperatura ambiente, adicionado 3 ml de água destilada e analisadas por leitura de  
188 absorbância, no aparelho *microplate reader Cary® 50* (Varian. Walnut Creek. CA. USA), no comprimento de  
189 onde de 540 nm (Teixeira et al. 2012). O experimento foi conduzido em triplicata e os resultados foram obtidos  
190 segundo a construção de uma curva padrão com concentrações conhecidas de xilose. A atividade enzimática foi  
191 expressa unidade de enzima (U), definida como quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µmol de  
192 açúcar redutor por mililitro por minuto em condições normalizadas (1U = 1 µmol/mL/min).

193

194

195 Caracterização molecular dos isolados

196

197 A identificação dos isolados foi baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Para isto, utilizaram-se  
198 os oligonucleotídeos iniciadores pR1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3') (Heyer et al. 1997) e  
199 p027 (5'-GAGAGT TTGATCCTGGCTCAG-3') (Lane et al. 1985). A reação de PCR (Reação em Cadeia da  
200 Polimerase) com um volume final de 50 µl consistiu na seguinte mistura: 1 µl de DNA (aprox. 50 ng), 7,5 µl  
201 MgCl<sub>2</sub> (25mM), 4 µl de dNTP's (2,5mM), 0,1 µl dos primers pR1387 e p027 (100mM), 5 µl Taq Buffer (10X),  
202 0,5 µl de Taq DNA polimerase (5 U.µL<sup>-1</sup>) e 31,8 µl de água Milli-Q autoclavada. A amplificação foi realizada  
203 em um termociclador Gene Pro Thermal Cycler utilizando a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C  
204 por 4 minutos, 35 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (63°C por 1 minuto), extensão  
205 (72°C por 1 minuto) e uma extensão final a 72°C por 10 minutos (Odee et al. 2002).

206 A purificação dos produtos de PCR (16S rRNA) para posterior sequenciamento foi realizada segundo  
207 Sambrook & Russell (2001) com algumas modificações. A reação de amplificação com um volume final de 10  
208 µl consistiu na seguinte mistura: 1,5 µl de tampão "Save Money" (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM  
209 MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), 1 µl do oligonucleotídeo p027 (5'-GAGAGTTTGTGATCCTGGCTCAG-3'), 1 µl de DNA  
210 (~80ng), 1 µl de "Big Dye" e 5,5 µl de água Milli-Q autoclavada. A amplificação foi realizada em um  
211 termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies) utilizando os seguintes ciclos: desnaturação  
212 inicial a 95°C por 1 minuto, 35 ciclos de desnaturação (96°C por 15 segundos), anelamento (50°C por 15  
213 segundos) e extensão (60°C por 4 minutos). Após o término da reação de sequenciamento, o produto de PCR foi  
214 purificado e precipitado com acetato de sódio e etanol e posteriormente submetido ao sequenciador automático  
215 ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Life Technologies), seguindo instruções do fabricante.

216 As sequências geradas foram importadas para o programa Codoncode Aligner v. 2.0.4 (CodonCode  
217 Corporation, Dedham, Massachusetts, USA). Por meio da ferramenta "clip ends" as sequências foram trimadas.  
218 Foram considerados somente os nucleotídeos com valor de qualidade de sequenciamento ≥ 500, equivalente à  
219 qualidade Phred > 20. As sequências válidas foram utilizadas para uma busca de similaridade por BLASTn no  
220 banco de dados GenBank (Basic Local Alignment Search tool) disponível no site NCBI (National Center for  
221 Biotechnology Information – www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências com maior similaridade com as obtidas no  
222 presente estudo foram utilizadas para a inferência com base em árvore filogenética construída com o auxílio do  
223 programa MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0). A árvore foi construída  
224 primeiramente pelo alinhamento das sequências realizado pelo Muscle, posteriormente convertido numa matriz  
225 de distância determinada pelo parâmetro Kimura-2 (Kimura 1980) e agrupada pelo método de Neighbor-Joining  
226 (Saitou and Nei 1987). A consistência da estrutura da árvore foi determinada pela análise de bootstrap, feita com  
227 base em 1000 sub-amostragens na matriz de distância. Sequências identificadas como *Streptomyces*,  
228 distantemente relacionadas às encontradas no presente trabalho foram utilizadas como out-group nesta filogenia.

229

230

231

232

233

234 **Resultados**

235

236 Isolamento

237

238 Para realizar a busca de bactérias xilanolíticas utilizou-se um meio de cultivo específico com xilana como única  
239 fonte de carbono. Ao todo foram obtidas 44 estirpes bacterianas isoladas de uma amostra composta de solo de  
240 manguezal. Dos 44 isolados apenas o 39 (*Bacillus stratosphericus*) não apresentou formação do halo.

241

242 Determinação do potencial enzimático – teste qualitativo

243

244 Das 44 estirpes bacterianas testadas, 43 demonstraram atividade xilanolítica quando submetidas ao método  
245 qualitativo *cup plate*. Apenas a estirpe 39 (*Bacillus stratosphericus*) não apresentou formação de halo de  
246 degradação. O isolado 29 (*Bacillaceae bacterium*) apresentou a formação de uma zona clara quando cultivada  
247 em MMX, porém devido ao seu padrão de crescimento desuniforme, não foi possível determinar o seu índice  
248 enzimático (IE). Os índices enzimáticos das estirpes variaram de 0 a 10,9. O isolado que apresentou o menor  
249 valor foi o 33 (*Bacillus sp. FJAT-21913*) com IE de 1,2 e o isolado que apresentou maior valor foi o 11 (*Bacillus*  
250 *megaterium*) com um IE de 10,9 (Figura 1).

251

252 Determinação do potencial enzimático – teste quantitativo

253

254 Independente dos resultados prévios obtidos os 44 isolados foram submetidos ao teste quantitativo. Destes,  
255 apenas dois (7 e 46) não se multiplicaram quando cultivados em MMX líquido, o que fez com que este ensaio  
256 tenha gerado resultados com 42 estirpes. A produção da enzima xilanolítica variou de 0,02 a 0,43 U/ml. O  
257 isolado 39 (*Bacillus stratosphericus*) que foi inicialmente considerado um micro-organismo não xilanolítico,  
258 pois não apresentou halo de degradação quando cultivado em MMX, demonstrou a maior atividade quando  
259 submetido ao método colorimétrico DNS com média de 0,43 U/ml. O isolado 3 (*Bacillus infantis*) foi o que  
260 apresentou a menor atividade enzimática com média de 0,02 U/ml (Figura 2).

261

262 Caracterização molecular dos isolados

263

264 Após o processamento inicial as sequências válidas foram utilizadas para uma busca de similaridade por  
265 BLASTn no banco de dados GenBank revelando valores de semelhança que variaram entre 99% a 100% com  
266 fragmentos de aproximadamente 400 – 1100 pares de bases. A reconstrução filogenética demonstrando as  
267 relações entre os isolados analisados com as sequências dos organismos mais similares presentes no banco de  
268 dados revelou a afiliação dos todos os isolados ao filo Firmicutes. O gênero *Bacillus*, pertencente à família  
269 Bacillaceae, abrigou 89% dos isolados. O gênero *Paenibacillus*, pertencente à família Paenibacellacea, abrigou  
270 os outros 11% dos isolados (Figura 3 e Tabela 1)

271

272

273 **Discussão**

274

275 Isolamento

276

277 O manguezal possui características físico-químicas consideradas inóspitas a outras espécies de vida (Booth et al.  
278 2002). É considerado um ambiente complexo não apenas por sua diversidade biológica, mas principalmente  
279 devido à sua diversidade funcional. Estes aspectos conferem a este ecossistema uma alta capacidade de  
280 resiliência e tendência a resistir mais eficientemente às perturbações tanto naturais quanto causadas pelo  
281 homem. Neste contexto, a escolha da área para o isolamento e obtenção das bactérias xilanolíticas, do ponto de  
282 vista biotecnológico, pode representar uma fonte promissora para a bioprospecção de micro-organismos de  
283 interesse comercial.

284

285 Determinação do potencial enzimático- teste qualitativo

286

287 Segundo Lealem & Gashe (1994), micro-organismos que possuem um IE maior ou igual a 2,0 são considerados  
288 bons produtores de enzimas extracelulares em meio sólido. Este parâmetro é utilizado por diversos autores como  
289 medida comparativa da atividade enzimática (Oliveira 2007; Fernandes, 2009; Asad et al. 2011; Pereira 2012;  
290 Carmo et al. 2014). Com base nesta premissa, temos que a maioria dos isolados apresentou altos índices de  
291 produção da enzima alvo. Se traçarmos um novo limite de seleção, com IE maior ou igual a 5,0 temos que 73%  
292 dos isolados apresentaram bons valores.

293 Quando comparados com os valores encontrados na literatura, os resultados de atividade xilanolítica  
294 das estirpes também podem ser considerados promissores. Eida et al. (2012), trabalharam com bactérias  
295 provenientes de duas compostagens (café e serragem) e obtiveram índices enzimáticos que variaram de 0,56 a  
296 2,84. Koroiva et al. (2013) trabalharam com o isolamento de bactérias presentes no trato digestivo do  
297 invertebrado *Stenochironomus*, responsáveis por degradar a material lignocelulósico utilizado como fonte de  
298 carbono por estes organismos. Os autores avaliaram a atividade xilanolítica das bactérias por meio do IE e  
299 obtiveram uma variação dos valores de 0 a 3,9. Singh et al. (2015) isolaram bactérias dos gêneros *Bacillus*,  
300 *Stenotrophomonas* e *Pseudomonas* do trato intestinal de coalas com índices enzimáticos que variaram de 0 a  
301 4,5. Os autores consideraram estes isolados como promissores na utilização em processos industriais. Tendo em  
302 vista que a maioria dos isolados obtidos no presente trabalho supera os valores encontrados na literatura, estes  
303 podem possivelmente serem considerados bons produtores de enzimas extracelulares com possível aplicação  
304 biotecnológica.

305

306 Determinação do potencial enzimático - teste quantitativo

307

308 O isolado 39 que não apresentou formação de halo de degradação pelo método *cup plate*, obteve o maior valor  
309 de atividade enzimática determinada pelo método DNS. Os valores de atividade enzimática nem sempre possui  
310 correlação com os valores de índice enzimático (IE). Bortolazzo (2011) encontrou resultados semelhantes ao  
311 observar que um de seus isolados fúngicos não possuía uma relação de alto índice enzimático com uma alta

312 produção de celulase. Segundo Almeida (2013), alguns de seus isolados fúngicos xilanolíticos e celulolíticos  
313 apresentaram altos índices enzimáticos, porém, menores quantidades de enzima produzidas.

314 O isolado 39 obteve apresentou uma atividade enzimática de 0,43 U/mL. Khianggam et al. (2012) isolaram  
315 bactérias xilanolíticas identificadas como *Paenibacillus* que apresentaram uma atividade entre 1,07 a 3,20  
316 U/mL. Seo et al. (2013) isolaram bactérias pertencentes a espécie *Bacillus licheniformis* que apresentaram  
317 atividade xilanolítica de 0,44 U/mL quando cultivados em meio mínimo com xilana. Além destes, outros autores  
318 reportaram atividade enzimática de bactérias do gênero *Bacillus* e *Streptomyces* alguns valores maiores àqueles  
319 encontrados no presente trabalho (Shoham et al. 1992; Subramaniyan et al. 2000; Dhillon et al. 2000; Beg et al.  
320 2000; Techapun et al. 2001).

321 Segundo Kulkarni et al. (1999), o rendimento na produção de xilanases em experimentos deste tipo é  
322 governado por alguns fatores-chave. Alguns deles possuem um efeito combinado sobre o nível da expressão  
323 gênica que dá origem a enzima, como por exemplo, acessibilidade ao substrato, quantidade de liberação e  
324 natureza química dos xilo-oligossacarídeos. Outros parâmetros que podem afetar a atividade e a produtividade  
325 de xilanase incluem o pH, temperatura e agitação (Kulkarni et al. 1999).

326 Amore et al. (2014) isolaram bactérias xilanolíticas do gênero *Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Streptomyces* a  
327 partir de solos húmicos com uma atividade enzimática bruta que variou de 0,4 a 0,6 U/mL. Porém, quando  
328 alteradas as condições de cultivo destes organismos, dois deles atingiram uma atividade máxima de 9,4 e 10,5  
329 U/mL. Isto deixa claro que diferentes formas de cultivo devem ser avaliadas de maneira atingir rendimentos  
330 elevados da produção enzimática (Porsuk et al. 2013; Gupta et al. 2013; Abo-State et al. 2013) .

331

332 Caracterização molecular dos isolados

333

334 O agrupamento das sequências com as pertencentes ao banco de dados GenBank revelou a afiliação dos todos os  
335 isolados bacterianos ao filo Firmicutes. Segundo Andreote et al. (2012), no estudo da microbiota dos  
336 manguezais por meio de análises metagenômicas, verificou que o filo Firmicutes foi o segundo mais abundante  
337 no mesmo manguezal utilizado no presente trabalho para o isolamento das bactérias xilanolíticas. Este grupo  
338 filogenético possui um papel essencial no processo de degradação de matéria orgânica e de xenobióticos, uma  
339 vez que possui uma grande capacidade de promover reações catabólicas de diversos compostos orgânicos  
340 recalcitrantes (Winderl et al. 2008).

341 O gênero *Bacillus* que abrigou o maior número de isolados é o grupo de maior importância  
342 biotecnológica e aplicação industrial dentro do domínio Bactéria (Schallmey et al., 2004). Inúmeras enzimas  
343 hidrolíticas pertencentes a este gênero vêm sendo caracterizadas. Entre elas destacam-se as xilanases (Nagar et  
344 al., 2010), celulasas (Romero-Garcia et al., 2009) e amilases (Asoodeh et al., 2010), com algumas já sendo  
345 utilizadas em larga escala nos processos de bioconversão (Maki et al., 2009). Do ponto de vista ecológico, o  
346 gênero *Bacillus* possui um papel fundamental para a manutenção dos ciclos biogeoquímicos. A maior parte das  
347 espécies que o compõe participa ativamente dos processos de decomposição de matéria orgânica. No gênero  
348 *Bacillus*, são descritos diversas xilanases extracelulares com ação livre e com multidomínios catalíticos.  
349 Segundo Schallmey et al. (2004), cepas deste gênero continuam a ser micro-organismos dominantes para a  
350 produção de enzimas com potencial biotecnológico.

351 O gênero *Paenibacillus* que abrigou o restante dos isolados é capaz de hidrolisar materiais  
352 lignocelulósicos e são frequentemente isolados e identificados a partir de amostras de solo e de planta (Rivas et  
353 al., 2005). Vários membros do gênero *Paenibacillus* secretam enzimas extracelulares como xilanase e celulase e  
354 seu sistema enzimático tem sido cada vez mais estudado pela comunidade científica (Gallardo et al, 2003; Pason  
355 et al, 2006; Lee et al., 2007).

356 De maneira geral, este estudo permitiu descrever os grupos microbianos cultiváveis, que apresentam  
357 alta capacidade xilanolítica, em amostras de sedimento de um manguezal contaminado com petróleo. Isto elenca  
358 os grupos de *Bacillus* e *Paenibacillus* como potenciais degradadores de material lignocelulósico que hospedam  
359 características enzimáticas complementares as condições ambientais prevalentes nos solos de manguezais. Este  
360 fato, pode possivelmente contribuir para novos estudos de atividade enzimática como alteração de temperatura,  
361 salinidade e pH para a descrição do potencial enzimático dos isolados obtidos no presente trabalho.

362

### 363 **Agradecimentos**

364 Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo financiamento  
365 da bolsa de iniciação científica da primeira autora. A Universidade de São Paulo, Departamento de Ciência do  
366 Solo e ao Laboratório de Microbiologia do Solo.

367

### 368 **Referencias**

- 369 Abo-state MAM, Ghaly MF, Abdellah EM (2013) Optimization of cellulase(s) and xylanase production by  
370 thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* isolates. American European Journal Agricultural Environmental Science  
371 13:553-564
- 372 Almeida, M (2013) Seleção de fungos filamentosos produtores de xilanases e celulases utilizando resíduos  
373 agroindustriais Cascavel-PR. Dissertação, Universidade Estadual do Oeste do Paraná
- 374 Alongi, DM, Christoffersen, P, Tirendi, F (1993) The influence of forest type on microbial-nutrient relationships  
375 in tropical mangrove sediments. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 17:201–223
- 376 Andreote FD, Jimenez DJ, Chaves D, Dias ACF, Luvizotto DM, Dini-Andreote F, Fasanella CC, Baena S,  
377 Lopez MV, Taketani RG, Melo IS (2012) The microbiome of brazilian mangrove sediments as revealed by  
378 metagenomics. PLOS ONE 7:386
- 379 Asad W, Asif M, Rasool SA (2011) Extracellular enzyme production by indigenous thermophilic bacteria:  
380 partial purification and characterization of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus* sp wa21. Pakistan Journal of Botany 43:1045-  
381 1052
- 382 Amore, AA, Parameswaran, P, Kumar R, Birolo L, Vinciguerra R, Marcolongo L, Ionata E, Lacara F, Pandey  
383 A, Faraco V (2015) Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's  
384 spent grain saccharification. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 9:573–581
- 385 Asoodeh A, Chamani JK, Lagzian MA (2010) Novel thermostable, acidophilic  $\alpha$ -amylase from a new  
386 thermophilic "*Bacillus* sp Ferdowsicus" isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and  
387 biochemical characterization International. Journal of Biological Macromolecules 46: 289-297
- 388 Beg QK, Bhushan B, Kapoor M, Hoondal GS (2000) Production and characterization of thermostable xylanase  
389 and pectinase from *Streptomyces* sp QG-11-3. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 24:396

390 Beg, QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a  
391 review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56:326-38

392 Biely P (1985) Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology* 3:286-90

393 Birijlall N, Manimaran A, Kumar KS, Permaul K, Singh S (2011) High level expression of a recombinant  
394 xylanase by *Pichia pastoris* NC 38 in a 5 L fermenter and its efficiency in biobleaching of bagasse pulp.  
395 *Bioresource Technology* 102:9723-9729

396 Booth IR, Cash P, O'Bryne C (2002) Sensing and adapting to acid stress. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:33-42

397 Bortolazzo NG (2011) Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrálise enzimática do bagaço de cana  
398 de açúcar. Dissertação, Universidade de São Paulo

399 Canetti EV (2004) Obtenção dos parâmetros e estudo cinético da hidrólise ácida dos resíduos florestais de  
400 eucalipto. Tese, Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

401 Carmo FL, Santos HF, Peixoto RS, Rosado AS, Araujo FV (2014) Tank bromeliad water: similar or distinct  
402 environments for research of bacterial bioactives? *Brazilian Journal of Microbiology* 45:185-192

403 Chiranjeevi T, Rani GB, Chandel AK, Sekhar PVS, Prakasham RS, Addepally U (2012) Optimization of  
404 holocellulosic enzymes production by *Cladosporium cladosporioides* using Taguchi- L'16 orthogonal array.  
405 *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 6:148-57

406 Damiano VB, Bocchini DA, Gomes E, Da Silva R (2003) Application of crude xylanase from *Bacillus*  
407 *licheniformis* 77-2 to the bleaching of eucalyptus Kraft pulp. *World Journal of Microbiology and*  
408 *Biotechnology's* 19: 139-144

409 De Vries RP, Visser J. (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides.  
410 *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65:497-522

411 Dingle J, Reid WW, Solomons GL (1953) The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides II  
412 Application of the "cup-plate" assay to the estimation of enzymes. *Journal Scienc Food and Agricultural* 4:149-  
413 155

414 Dhillon A, Gupta, JK, Jauhari BM, Khanna S (2000) A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase  
415 produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp  
416 *Bioresource Technology* 73:273

417 Eida MF, Nagaoka T, Wasaki J & Kouno K (2012) Isolation and characterization of cellulose-decomposing  
418 bacteria inhabiting sawdust and coffee residue composts. *Microbes and Environments* 27: 226–233

419 Fernandes NA (2009) Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes  
420 Lavras. Dissertação, Universidade Federal de Lavras

421 Gallardo O, Diaz P, Pastor FIJ (2003) Characterization of a *Paenibacillus* cell-associated xylanase with high  
422 activity on aryl-xylosides: a new subclass of family 10 xylanases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61:  
423 226–233

424 Gupta G, Sahai V, Gupta RK (2013) Optimization of xylanase production from *Melanocarpus albomyces* using  
425 wheat straw extract and its scale up in stirred tank bioreactor *Indian Journal of Chemical Technology* 20:282-  
426 289

427 Heyer E, Puymirat J, Dieltjes P, Bakker E, Knijff P (1997) Estimating Y chromosome specific microsatellite  
428 mutation frequencies using deep rooting pedigrees. *Human Molecular Genetics* 6:799–803

429 Hough, D, Danson, M (1999) Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology* 3:39-46

430 Jiang Z, Bail AL, Wu A (2008) Effect of the thermostable xylanase B (XynB) from *Thermotoga maritima* on the

431 quality of frozen partially baked bread. *Journal of Cereal Science* 47:172-179

432 Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A (2008) A rapid and easy method for the detection of microbial

433 cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology* 57:503-507

434 Kathiresan K, Qasim SZ (2005) Biodiversity of mangrove ecosystems. Hindustan Publishing Corporation, New

435 Delhi

436 Kalogeris E, Christakopoulos P, Vrsanská M, Kekos D, Macris BJ (2001) Catalytic properties of the

437 endoxylanase I from *Thermoascus aurantiacus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11:491-501

438 Kimura MA simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies

439 of nucleotide sequences *Journal of Molecular Evolution, Oxford*, v 16, p 11–120, 1980

440 Khiangam SK, Akaracharanya A, Visessanguan W, Kim K, Chul Lee K, Lee J, Tanasupawat S (2012)

441 Characterization of xylanolytic *Paenibacillus* strains isolated in Thailand International. *Journal Of Bioassays*

442 11:144-149

443 Koroiva R, Souza CWO, Toyama D, Henrique-Silva F, Fonseca-Gessner AA (2012) Lignocellulolytic enzymes

444 and bacteria associated with the digestive tracts of *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) larvae. *Genetics*

445 *and Molecular Research* 12:3421–3434

446 Kulkarni N, Shendye A, Rao M (1999) Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS*

447 *Microbiology Reviews* 23: 411– 456

448 Lane DJ, Pace GJ, Olsen DA, Stahl ML, Sogin NR (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA

449 sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82:6955-6959

450 Lealem F, Gashe BA (1994) Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef

451 (*Eraglostis tef*). *Journal of Applied Bacteriology* 77:348-352

452 Lee TH Lim PO, Lee YE (2007) Cloning, characterization, and expression of xylanase A gene from

453 *Paenibacillus* sp. DG-22 in *Escherichia coli*. *Journal of Microbial Biotechnology* 17:29–36

454 Maki M, Leung KT, Qin W (2010). The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of

455 lignocellulosic biomass. *Int. J. Biol. Sci.*, 5:500–516

456 Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical*

457 *Chemistry* 31:426-428

458 Nascimento WCA, Silva CR, Carvalho RV, Martins MLL (2007) Otimização de um meio de cultura para a

459 produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 27:417-421

460 Nagar AE, Huys R, Bishop JDD (2010) Widespread occurrence of the Southern Hemisphere ascidian *Corella*

461 *eumyota* Traustedt, 1882 on the Atlantic coast of Iberia. *Aquatic Invasions* 5:169–173

462 Odee DW, Haukka K, Mcinroy SG, Sprent JI, Sutherland JM, Young JPW (2002) Genetic and symbiotic

463 characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse

464 sites in Kenya. *Soil Biology and Biochemistry* 34:801-811

465 Oliveira RQ (2007) Bioprospecção de microrganismos leveduriformes produtores de pectinases extracelulares

466 isolados do Semi-árido baiano. *Dissertação, Universidade Estadual de Feira de Santana*

467 Pereira VM (2012) Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de  
468 celulases por *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Wehmer. Dissertação, Universidade Federal de Lavras

469 Pason P, Kyu KL, Ratanakhanokchai K. (2006) *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 xylanolytic–cellulolytic  
470 enzyme system that degrades insoluble polysaccharides. *Applied Environmental Microbiology* 72:2483–2490

471 Poorna CA, Prema P (2006) Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using  
472 agroindustrial residues. *Biochemical Engineering Journal* 32: 106-112

473 Porsuk I, Özakin S, Bali B, İn E Yilmaz E (2013) A cellulase-free, thermoactive, and alkali xylanase production  
474 by terrestrial *Streptomyces* sp. CA24. *Turkish Journal of Biology* 37:370-375

475 Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS (2005) “Xylanases from fungi:  
476 Properties and industrial applications”. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67:577-591

477 Rivas R, Mateos PF, Martinez-Molina E, Velázquez E (2005) *Paenibacillus xylanilyticus* sp. nov., an airborne  
478 xylanolytic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 405–408

479 Romero-Garcia S, Hernandez-Bustos C, Merino E, Gosset G, Martinez A (2009) Homolactic fermentation from  
480 glucose and cellobiose using *Bacillus subtilis*. *Microbial Cells Factories* 8: 23–30

481 Said S, Pietro R. (2002) Enzimas de interesse industrial e biotecnológico. Eventos, Rio de Janeiro

482 Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.  
483 *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425

484 Samanta AK, Kolte AP, Senani S, Sridhar M, Jayapal N (2011). A simple and efficient diffusion technique for  
485 assay of endo-b-1,4-xylanase activity. *Brazilian Journal of Microbiology* 42:1349–1353

486 Schaeffer-Novelli Y, Cintrón-Molero G, Soares MLG, De-Rosa T (2000) Brazilian mangroves. *Aquatic*  
487 *Ecosystem Health & Management* 3:561-570

488 Sambrook J, Russel, DW (2001) "Molecular Cloning, a Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory  
489 Press 3:2028

490 Seo JK, Park TS, Kwon IH, Piao MY, Lee CH, Ha JK (2013) Characterization of cellulolytic and xylanolytic  
491 enzymes of *Bacillus licheniformis* JK7 isolated from the rumen of a native Korean goat. *Asian Australasian*  
492 *Journal of Animal Sciences* 26:50–58

493 Schallmey M, Singh A, Ward OP (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production.  
494 *Canadian Journal of Microbiology* 50:1-17

495 Shallom D, Shoham Y (2003) Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* 6:219-228

496 Sharma R, Soni S, Vohra R, Gupta L, Gupta J (2002) Purification and Characterisation of a Thermostable  
497 Alkaline Lipase from a New Thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochemistry* 37:1075–1084

498 Singh S, Thavamani P, Megharaj M, Naidu R (2015) Multifarious activities of cellulose degrading bacteria from  
499 Koala (*Phascolarctos cinereus*) faeces. *Journal of Animal Science and Technology* 1:57:2

500 Stamford TLM, Araújo JM, Stamford NP (1998) Enzymatic Activity of microorganisms isolated from yam bean  
501 legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 18:  
502 382-385

503 Shoham Y, Schwartz Z, Khasin A, Gat O, Zosim Z, Rosenberg E (1992) Delignification of wood pulp by a  
504 thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* strain T-6. *Biodegradation* 3:207-218

505 Subramaniyan S (2000) Studies on the Production of Bacterial Xylanases. Ph.D. Thesis, Cochin University of  
506 Science and Technology

507 Tan SS, Li DY, Jiang ZQ, Zhu YP, Shi B, Li LT (2008) Production of xylobiose from the autohydrolysis  
508 explosion liquor of corncob using Thermotogamaritima xylanase B (XynB) immobilized on nickel-chelated  
509 Eupergit C. Bioresource Technology 99:200-204

510 Techapun C, Sinsuwongwat S, Poosaran N, Watanabe M, Sasaki K (2001) Production of a cellulase-free  
511 xylanase from agricultural waste materials by thermotolerant Streptomyces sp. Biotechnology Letters Journal's  
512 23:1685

513 Teixeira RSS, Da Silva AS, Ferreira-Leitão VS & Bom EPDS (2012) Amino acids interference on the  
514 quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity  
515 measurements. Carbohydrate Research 363:33–37

516 Ventosa A, Nieto JJ, Oren A (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiology and  
517 Molecular Biology Reviews 62:504-44

518 Winderl C, Anneser B., Griebler C, Meckenstock RU, Lueders T. (2008) Depth-resolved quantification of  
519 anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil  
520 contaminant plume. Applied and Environmental Microbiology 74:792–801

521 Zahran HH (1997) Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. Biol Fertil  
522 Soils 25:211–223

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544 **Legenda das figuras**

545

546 **Figura 1:** Índice enzimático (IE) dos 44 isolados bacterianos provenientes de uma amostra composta de  
547 sedimento de manguezal, área de derramamento de petróleo, localizada na cidade de Bertioga, São Paulo. O IE  
548 foi calculado pela razão do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (cm). As  
549 barras de erros indicam o desvio padrão acima da média (n = 3).

550 **Figura 2:** Atividade xilanolítica quantitativa de 42 isolados bacterianos provenientes de uma amostra composta  
551 de sedimento de manguezal, área de derramamento de petróleo, localizada na cidade de Bertioga, São Paulo. A  
552 atividade foi medida pela proporção de açúcares redutores liberados pela hidrólise enzimática da xilana. As  
553 barras de erros indicam o desvio padrão acima da média (n = 3).

554 **Figura 3:** Reconstrução filogenética demonstrando as relações entre os isolados analisados com as sequências  
555 dos organismos mais similares presentes no banco de dados. A filogenia foi determinada pelo método Neighbor  
556 joining e a relação entre as sequências foi inferida usando método muscle. Sequências de *Streptomyces* foram  
557 usadas como grupo externo para enraizamento da árvore. Os valores nos ramos indicam a frequência de  
558 agrupamento dos mesmos, determinada pelo teste de bootstrap, com replicação de 1000 vezes.

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

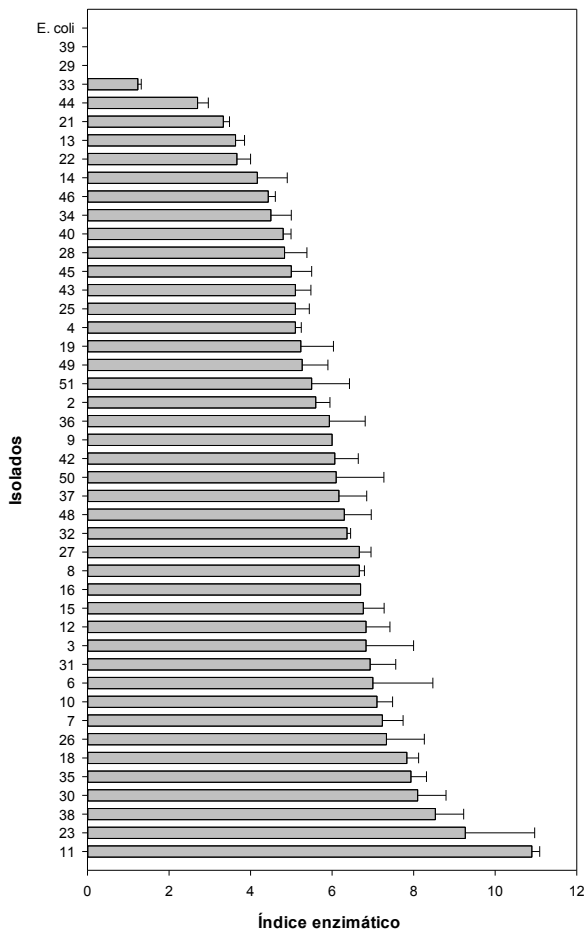
580

581

582

## Figuras

### Figura 1



### Figura 2

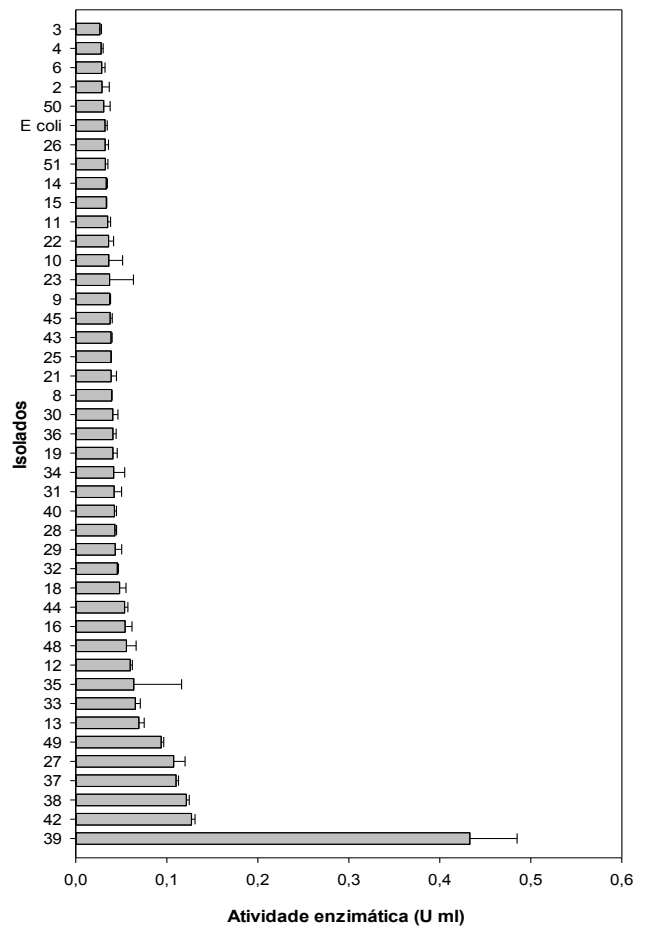
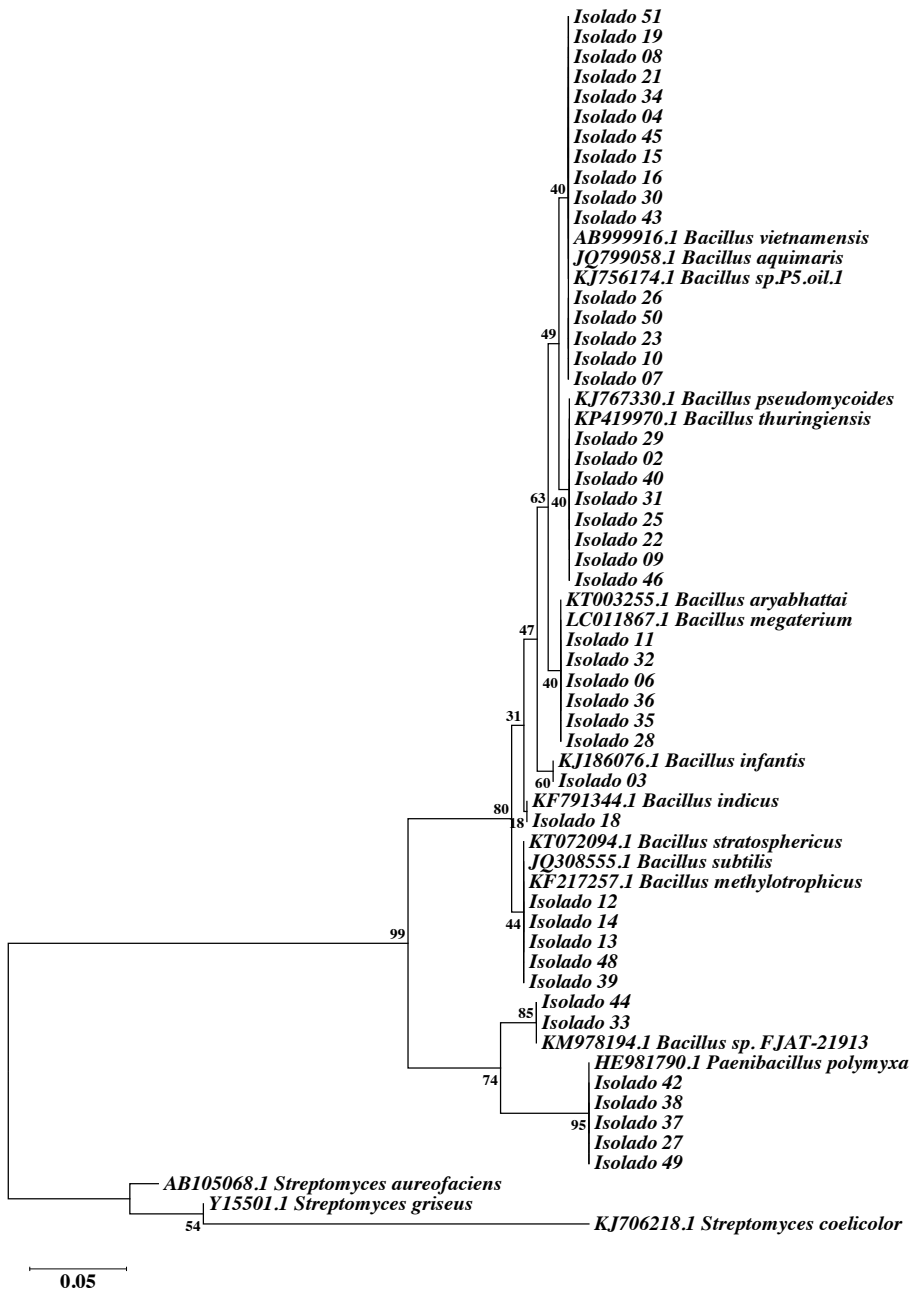


Figura 3



**Tabela1:** Caracterização por similaridade obtida a partir da comparação das sequencias parciais do gene 16S rRNA de bactérias xilanolíticas isoladas de sedimento de manguezal com as sequências contidas no banco de dados GenBank. (fragmentos de aproximadamente 400 -1100 pares de bases)

(Continua)

Isolados	NCBI*	Nº de acesso	E-value**	IS (%)***
2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KP419970.1	0	99%
3	<i>Bacillus infantis</i>	KJ186076.1	0	99%
4	<i>Bacillus sp. P5.oil.1</i>	KJ756174.1	0	99%
6	<i>Bacillus megaterium</i>	LC011867.1	0	99%
7	<i>Bacillus vietnamensis</i>	AB697709.1	0	99%
8	<i>Bacillus sp. P5.oil.1</i>	KJ756174.1	0	99%
9	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	KJ767330.1	0	99%
10	<i>Bacillus sp. P5.oil.1</i>	KJ756174.1	0	99%
11	<i>Bacillus megaterium</i>	LC011867.1	0	99%
12	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	KF217257.1	0	99%
13	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	KC573497.1	0	98%
14	<i>Bacillus subtilis</i>	JQ308555.1	0	99%
15	<i>Bacillus sp. P5.oil.1</i>	KJ756174.1	0	95%
16	<i>Bacillus aquimaris</i>	JQ799058.1	0	99%
18	<i>Bacillus indicus</i>	KF791344.1	0	99%
19	<i>Bacillus sp. P5.oil.1</i>	KJ756174.1	0	99%
21	<i>Bacillus vietnamensis</i>	AB999916.1	0	99%
22	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	KJ767330.1	0	99%
23	<i>Bacillus aquimaris</i>	JQ799058.1	0	98%
25	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KP419970.1	0	99%
26	<i>Bacillus sp. P5.oil.1</i>	KJ756174.1	0	98%
27	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	HE981790.1	0	99%
28	<i>Bacillus megaterium</i>	LC011867.1	0	99%
29	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KP419970.1	0	100%
30	<i>Bacillus vietnamensis</i>	AB999916.1	0	99%
31	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KP419970.1	0	99%
32	<i>Bacillus megaterium</i>	KP419970.1	0	99%
33	<i>Bacillus sp. FJAT-21913</i>	KM978194.1	0	99%
34	<i>Bacillus sp. P5.oil.1</i>	KJ756174.1	0	99%
35	<i>Bacillus aryabhattai</i>	KT003255.1	0	99%
36	<i>Bacillus megaterium</i>	LC011867.1	0	99%
37	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	HE981790.1	0	99%
38	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	KC189948.1	0	98%
39	<i>Bacillus stratosphericus</i>	KT072094.1	0	99%
40	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	KJ767330.1	0	98%

**Tabela1:** Caracterização por similaridade obtida a partir da comparação das sequências parciais do gene 16S rRNA de bactérias xilanolíticas isoladas de sedimento de manguezal com as sequências contidas no banco de dados GenBank. (fragmentos de aproximadamente 400 -1100 pares de bases)

(conclusão)				
<b>Isolados</b>	<b>NCBI*</b>	<b>Nº de acesso</b>	<b>E-value**</b>	<b>IS (%)***</b>
<b>42</b>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	HE981790.1	0	99%
<b>43</b>	<i>Bacillus aquimaris</i>	JQ799058.1	0	98%
<b>44</b>	<i>Bacillus sp. FJAT-21913</i>	KM978194.1	0	99%
<b>45</b>	<i>Bacillus vietnamensis</i>	AB999916.1	3.00E-180	
<b>46</b>	<i>Bacillus pseudomycoides</i>	KJ767330.1	0	99%
<b>48</b>	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	KP019256.1	0	100%
<b>49</b>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	HE981790.1	0	99%
<b>50</b>	<i>Bacillus vietnamensis</i>	AB697709.1	0	98%
<b>51</b>	<i>Bacillus sp. P5.oil.1</i>	KJ756174.1	0	99%

\*National Center for Biotechnology Information; \*\* O valor do e-value sugere que quanto mais próximo de zero este estiver, mais confiável é o alinhamento das sequências; \*\*\*Índice de similaridade: 0-100%