



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS V- MINISTRO ALCIDES CARNEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ANNA GABRIELLY DUARTE NEVES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS EDÁFICAS EM UMA
ÁREA DE PRESERVAÇÃO NO SEMIÁRIDO PARAIBANO**

JOÃO PESSOA 2016

ANNA GABRIELLY DUARTE NEVES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS EDÁFICAS EM UMA ÁREA DE
PRESERVAÇÃO NO SEMIÁRIDO PARAIBANO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Brígida Thais
Luckwu Lucena

JOÃO PESSOA 2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

N513i Neves, Anna Gabrielly Duarte
Identificação molecular de bactérias edáficas em uma área de preservação no semiárido paraibano [manuscrito] / Anna Gabrielly Duarte Neves. - 2016.
34 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2016.

"Orientação: Profa. Dra. Brígida Thais Luckwu Lucena, Departamento de Ciências Biológicas".

1. Bactéria. 2. Semiárido. 3. Identificação molecular. I. Título.

21. ed. CDD 615.329

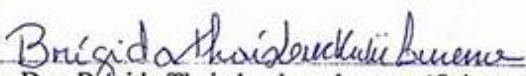
ANNA GABRIELLY DUARTE NEVES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS EDÁFICAS EM UMA
ÁREA DE PRESERVAÇÃO NO SEMIÁRIDO PARAIBANO**

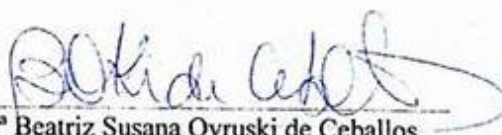
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito
parcial à obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 23/10/2016.

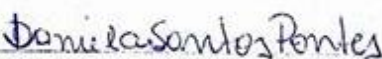
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Brígida Thais Luckwu Lucena (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profª Drª Beatriz Susana Ovruski de Ceballos
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Daniela Santos Pontes
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

AGRADECIMENTOS

Quando somos crianças, durante as aulas de ciências, sonhamos em cientistas como pesquisadores atrelados a experimentos dos mais variados, e almejamos ao menos, termos um momento com esses experimentos, com esses pesquisadores, com esses cientistas. Agora me torno bióloga e pesquisadora, buscando pelas curiosidades do mundo da ciência, pelas maravilhas do mundo da vida, que é a Biologia. E sendo assim, agradeço ao CNPQ e à UEPB, pela possibilidade de ser iniciada nesse mundo.

Entretanto, nada disso seria possível sem o apoio daqueles que nos impulsionam a sermos bons profissionais, bons pesquisadores, bons curiosos e admiradores das mais diversas áreas. Sendo assim, agradeço aos docentes e profissionais, que mesmo diante das adversidades foram excelentes formadores de mentes e pessoas. Agradeço pelos diversos discursos de estimulação, pela atenção e carinho ao nos ensinar, e principalmente, na vontade de nos impulsionar a sermos não bons biólogos, mas os melhores.

Agradeço de forma particular a minha orientadora, Brígida Lucena, por toda paciência, por todo apoio e por todo engajamento ao me orientar. Sobretudo por me fazer ter ainda mais vontade de conhecer o mundo da genética, tão temido por muitos, mas tão amado por aqueles que o querem desbravar.

Todo meu carinho aos que me acompanharam no dia a dia de laboratório, que foram não só parceiros de trabalho ou de curso, mas se tornaram meus amigos. Aos meus parceiros do GDBM, que dividiram géis, PCRs e nossas bactérias, não posso desejar mais do que muito sucesso, sobretudo a minha parceira de trabalho, de pesquisa e de PIBIC, Raissa Ferreira. Mas, sejam do GDBM, do LEFA, do LBM ou do LECOMP, vocês foram essenciais nesses anos de pesquisa, nesses anos de universidade, e serão sempre essenciais na minha vida, além das paredes da UEPB.

Aos meus amigos de sala, de curso, de tantos trabalhos, estudos, congressos e aulas, aos quais agradeço e agradeço todos os dias, os relembro quanto foram importantes. Viramos noites juntos, nos desesperamos juntos, superamos e vencemos juntos. Amo vocês todos.

A minha família, meus primeiros formadores, meu primeiro apoio e principais responsáveis por essa formação, todo agradecimento seria pouco.

E por fim, ofereço e não somente agradeço, todo esse trabalho e os demais que virão, a Deus, que no silêncio, mês fez ter calma, mansidão e paciência tantas vezes.

“Se você quer os acertos, esteja preparado para os erros.”

Carl Yastrzemski

RESUMO

A comunidade microbiana de solos é imprescindível ao funcionamento ecossistêmico, sobretudo em ambientes com condições de adversidade como o semiárido brasileiro, sujeito a desertificação, decorrentes das condições abióticas, esperando-se uma comunidade de bactérias especializadas. O estudo objetivou identificar bactérias isoladas em quatro parcelas do solo da RPPN Fazenda Tamanduá, através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Resultando na identificação de bactérias pertencente aos filos *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*, representados por treze gêneros, com *Bacillus* sendo o mais abundante. Foram identificadas vinte e três espécies, onde *Leifsonia shinshuensis*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Micrococcus luteus* foram as mais abundantes nas parcelas estudadas, enquanto de forma geral, a espécie de maior representatividade foi *Bacillus megaterium*. Os isolados identificados como *Bacillus megaterium* foram tipados geneticamente a partir da REP-PCR com o “primer” (GTG)₅, resultando em nove perfis genéticos distintos, indicando a ocorrência de diferentes linhagens em parcelas distintas e numa mesma parcela. A continuação de estudos acerca da microbiota da Caatinga é de suma importância, principalmente pelas particularidades climáticas do ecossistema, com espécies endêmicas e uma biodiversidade pouco conhecida, podendo fornecer novas alternativas para bioprospeção de enzimas e substâncias bioativas, constituindo uma alternativa para desenvolvimento econômico e social da região, além de ser útil para programas de conservação e manejo do bioma.

Palavras-chave: Bactéria, Semiárido, identificação molecular.

ABSTRACT

The study aimed to identify bacteria isolated in four soil plots of RPPN Fazenda Tamanduá by partially sequencing 16S rRNA. Resulting in the identification of bacteria belonging to the phylum *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*, represented by thirteen genera, with *Bacillus* being the most abundant. Twenty-three species were identified, where *Leifsonia shinshuensis*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Micrococcus luteus* were the most abundant in the plots studied, while in general, the most representative specie was *Bacillus megaterium*. The isolates identified as *Bacillus megaterium* were genetically typed from the REP-PCR with the "primer" (GTG)₅, resulting in nine different genetic profiles, indicating the occurrence of different strains, on different plots and in the same plots. The continuation of studies on the Caatinga microbiota is of paramount importance, especially the climate characteristics of the ecosystem, with endemic species and a little-known biodiversity. May provide new alternatives to bioprospection of enzymes and bioactive substances, providing an alternative to economic and social development the region, in addition to being useful for conservation and management of the biome programs.

Keywords: Bacteria, Semi-arid, molecular identification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fluxograma resumido das metodologias adotadas para desenvolvimento do estudo	9
Figura 2: Metodologia de isolamento com enriquecimento (Soares, 2012)	11
Figura 3: Diluição seriada e inoculação de bactérias em meio sólido	11
Figura 4: Metodologia de extração de DNA dos isolados	13
Figura 5: Representatividade dos filos na Fazenda Tamanduá quanto a distribuição de gêneros identificados.	17
Figura 6: Distribuição dos isolados bacterianos identificados na Fazenda Tamanduá .	19
Figura 7: Perfis de Rep-PCR obtidos dos isolados da Fazenda Tamanduá	24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das parcelas amostradas na Fazenda Tamanduá..... 15
- Tabela 2:** Características físico-químicas do solo das parcelas da Fazenda Tamanduá 20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APA - Área de Proteção Ambiental

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BLAST N – *BLAST* Padrão de nucleotídeo

Bsh - Clima tropical semiárido

dNTP - Desoxinucleotídeos trifosfatos

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ERIC - *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*

FT1 – Parcela 1

FT5 – Parcela 5

FT7 – Parcela 7

FT9 – Parcela 9

GDBM – Grupo de Diversidade e Biotecnologia Microbiana

MLEE - Eletroforese de Enzimas Multilocus

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

P1 – Perfil 1

P2 – Perfil 2

P3 – Perfil 3

P4- Perfil 4

P5 – Perfil 5

P6- Perfil 6

P7 – Perfil 7

P8 – Perfil 8

P9 – Perfil 9

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RAPD - Reação de amplificação aleatória de DNA polimórfico

RDP - *Ribosomal Database Project*

REP - Elementos palindrômicos repetitivos

rep-PCR - PCR de elementos palindrômicos repetitivos

RPPN - Reserva Particular do Patrimônio Natural

rRNA - RNA ribossômico

TBE - Tris/Borato/EDTA

TE – Tampão Tris-EDTA

TSB – Caldo Triptona de Soja

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

UC – Unidade de Conservação

LISTA DE SÍMBOLOS

cm – Centímetro

dm – Decímetro

h – Hora

ha – Hectare

Km – Quilometro

m – Metro

mg – Miligrama

min – Minuto

mm – Milímetros

mM – Milimolar

mL – Mililitro

P – Fósforo

pb – Pares de base

pH - Potencial hidrogeniônico

pmol – Picomol

rpm – Rotações por minuto

V – Volt

V% - Porcentagem de Saturação de Bases

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

μL – Microlitro

μm – Micrómetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	8
2.1. OBJETIVO GERAL	8
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	8
3. METODOLOGIA	9
3.1. ÁREA DE TRABALHO	9
3.2. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS	10
3.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	12
3.3.1. Extração de DNA.....	12
3.3.2. Sequenciamento.....	13
3.3.3. rep-PCR	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1. ANÁLISE DE ABUNDANCIA E DENSIDADE DE BACTÉRIAS	15
4.2. ANÁLISE MORFOLÓGICA DE BACTÉRIAS NA FAZENDA TAMANDUÁ 16	
4.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DA FAZENDA TAMANDUÁ	16
4.3.1. Análise da abundância e diversidade de espécies.....	18
4.4. ANÁLISE DA ESPÉCIE DE MAIOR REPRESENTATIVIDADE DA FAZENDA TAMANDUÁ	21
4.4.1. Identificação intraespecífica de <i>Bacillus megaterium</i>	23
5. CONCLUSÃO	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos representam a maior diversidade específica do planeta, sendo a comunidade microbiana de solos considerada mais diversa que em qualquer outro ambiente, devido principalmente a quantidade de micro-habitats disponíveis à colonização, com gradientes abióticos e condições ambientais descontínuas. A disposição de habitats é assim, considerada numa microescala, diferindo em composição entre as porosidades do solo, possivelmente devido às diferenças de concentrações nutricionais ou de oxigênio, que podem chegar a uma variação de 21% (Torsvik e Øvreås, 2002; Horner-Devine *et al.*, 2004; Delmont *et al.*, 2015). Essa variação de habitats difere ainda entre rizosfera e solo a granel, onde os micro-habitats podem ocorrer em macroporos, microporos, macroagregados, microagregados, entre outros (Lynch *et al.*, 2004). O solo age, então, como fator selecionador, estando intimamente ligado a manutenção e balanço ecossistêmico, influenciando diversos fatores químicos, físicos e biológicos, impulsionando a composição e diversidade da microbiota, e a dinâmica dos ciclos biogeoquímicos (De Araújo e Monteiro, 2007; Silva *et al.*, 2010).

Definido como um sistema complexo, o solo é formado a partir de processos climáticos e atividades de organismos vivos – que incluem macrofauna, mesofauna, microfauna e microflora - sobre um material parental, ou horizonte C, influenciado pela topografia (Nannipieri *et al.*, 2003; Giri *et al.*, 2005). É uma interface entre matéria orgânica, matéria mineral, água e ar, em que a distribuição e disponibilidade desses componentes interferem na produtividade e qualidade do solo. Os componentes minerais derivam da rocha de origem e seu intemperismo, incluindo partículas de tamanho diferentes, de areia, silte e argila, que repercutem sobre a estrutura e diversidade da comunidade microbiana. Os gases componentes, distribuídos conforme a porosidade do solo, incluem oxigênio, nitrogênio, dióxido de carbono e outros (Nannipieri *et al.*, 2003; De Araújo e Monteiro, 2007; Rodrigues, 2011).

Os horizontes são relativos à profundidade do solo, onde o horizonte O, é composto da camada orgânica não decomposta, ou serapilheira; o horizonte A é definido como o solo superficial, contendo a maior parte da atividade microbiana, sobretudo em regiões de vegetação, uma vez que é a região de maior abundância de raízes; o horizonte B é mais pobre em húmus que o anterior, e a região com maior presença de minerais de argila de silicato, e acúmulo de minerais lixiviados, chamado ainda de subsolo; e por fim, o horizonte C constitui a base do solo, ou seja, o material de origem ou parental com pouca atividade microbiana (Giri *et al.*, 2005; Madigan *et al.*, 2010).

Acredita-se que em um grama de solo encontram-se de um a dez bilhões de células bacterianas, em que cerca de 0,5% do solo corresponde a atividade biológica, que é composta em sua maioria de microrganismos, concentrados nos primeiros trinta centímetros de profundidade, responsáveis pela manutenção de nutrientes no sistema, através da ciclagem de nutrientes e em alguns casos pela aquisição desses nutrientes (Zilli *et al.*, 2003; De Araújo e Monteiro, 2007; Delmont *et al.*, 2015).

A microbiota do solo ou biomassa microbiana do solo é a fração viva da matéria orgânica, integrada principalmente por fungos e bactérias, imprescindíveis para o desenvolvimento de outros organismos, seja por disponibilizar nutrientes, pelo consumo ou pelas associações (De Araújo e Monteiro, 2007; Aburjaile *et al.*, 2012; Rampelotto *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2015). São os principais responsáveis pela decomposição orgânica, e, em alguns casos, inorgânica através da biorremediação, reciclagem do carbono e reserva e disponibilidade de diversos outros nutrientes (Alvarez *et al.*, 1998; Gorlach-Lira e Coutinho, 2007; Schimel *et al.*, 2007; Lange *et al.*, 2014).

A capacidade decompositora, sobretudo de bactérias, está associada à produção enzimática extracelular, de proteases, amilases, celulasas e quitinasas. Em geral, bactérias Gram negativas são responsáveis, principalmente, pela decomposição de moléculas de baixo peso molecular, enquanto as Gram positivas por moléculas de maior complexidade. As bactérias gram positivas são consideradas, ainda, mais resistentes a eventos de seca do que gram-negativas, possivelmente devido à camada espessa de peptidoglicanos compondo sua parede celular (Gorlach-Lira e Coutinho, 2007; Lange *et al.*, 2014).

Alterações bióticas e abióticas no solo refletem diretamente sobre a estrutura e composição das comunidades microbianas, e, por conseguinte, as demais comunidades biológicas (Balota *et al.*, 1998; Carneiro *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010). Entre os fatores bióticos que influenciam as comunidades microbianas, podemos citar as interações com macroinvertebrados que agem como dispersores de células bacterianas, resultando em colonizações adjacentes pela microbiota (Wardle, 2006).

Dentre os fatores abióticos que impulsionam a sucessão da microbiota edáfica, enumera-se o pH, temperatura, precipitação e disponibilidade de nutrientes. Onde o pH, associado a diversas reações químicas do solo, pode ser alterado pela temperatura e precipitação ambiental, refletindo na disponibilidade e composição dos nutrientes locais (Camargo *et al.*, 2009). Desta forma, os fatores abióticos agem como perturbações para microbiota, influenciando sobre a flutuação da comunidade microbiana. E, portanto, padrões de perturbação têm sido estudados para mediação das condições edáficas com base na resiliência dos organismos, sabendo-se que

em solos de menor matéria orgânica, mais forte será a oscilação da comunidade (Van Bruggen *et al.*, 2006).

O ciclo da seca é o estresse ambiental mais comum no planeta, uma vez que um terço da Terra apresenta climas áridos, semiáridos, ou sazonalmente árido, hiperáridos, alpinos, ou polares, que constituem regiões secas ou regiões de colapso hídrico, compostos de solos tipicamente secos, limitando o substrato de difusão à microbiota, quanto à obtenção de recursos e a continuidade dos ciclos biogeoquímicos (Schimel *et al.*, 2007).

Para suportar estresses, como a seca, os microrganismos têm mecanismos de adaptação selecionados evolutivamente, ou mecanismos de aclimação fisiológica, que podem alterar a composição da microbiota devido à ciclagem de nutrientes, acumulação de solutos, e consequente redução do potencial hídrico das células, que podem resultar em esporulação em alguns grupos como *Bacillus* (Schimel *et al.*, 2007; Lançoni *et al.*, 2013). A microbiota pode variar, ainda, de acordo com o histórico de perturbações do solo, causada por correção do solo, irrigação, plantio direto e estrutura da comunidade vegetal (Buckley e Schmidt, 2001).

No Brasil o ciclo da seca é pronunciado principalmente no Semiárido, que compreende do paralelo de 3° 17"S e o meridiano 35° 45"W ou 3-17uS para 35-45uW, correspondente a região Nordeste, o sudoeste do Piauí e porções do interior da Bahia e do Norte de Minas Gerais, com extensão de 969.589,4 km² (Ministério De Integração Nacional - MI, 2005, p. 5).

O Semiárido é um dos ecossistemas brasileiros de maior endemismo, popularmente denominado por Caatinga, sendo considerado um *Hotspot*, devido sua biodiversidade elevada. O bioma tem 5,3% de seu território protegido, com 46 unidades de conservação (UCs) distribuídas numa área de cerca de 42.558,36 km² (Leal *et al.*, 2007). Entretanto, ainda é considerado o segundo ecossistema com maior degradação no país, no qual a combinação de atividades antrópicas, como: atividade agrícola, pecuária, extrativismo, técnicas de irrigação inadequadas e densidade populacional, têm reduzido substancialmente o número de espécies endêmicas.

Essas atividades alteram a dinâmica ecossistêmica, resultando na formação de núcleos de desertificação, assoreamento dos rios e desgaste do solo, pela exposição a fatores abióticos, e consequentemente empobrecendo e reduzindo o potencial produtivo do solo, principalmente pela modificação da comunidade microbiana. A exploração insustentável desse ambiente, pouco conhecido e complexo, poderá colaborar a degradação irreversível da estrutura física, química e biológica do ecossistema (Pereira *et al.*, 2001; Souto *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2010)

Esse bioma representa o maior domínio territorial do semiárido sul americano, conhecido, sobretudo por suas particularidades climáticas. Nessa região a estação chuvosa é

bem definida e concentrada nos meses de dezembro e janeiro, março e abril, ou maio e junho, com profusão média em torno de 500-800 mm/ano, e com temperatura entre 25°C e 30°C, diminuindo nas serras e chapadas (Alves *et al.*, 2009; Kavamura *et al.*, 2013; Lançoni *et al.*, 2013).

Em ambientes de clima árido, ou semiárido, os fatores biológicos são estritamente inerentes as variações de temperatura e precipitação, que atuam na deriva e seleção das comunidades, agindo como moduladores da fauna microscópica local. A precipitação influencia a disponibilidade de oxigênio no solo, a concentração e disponibilidade de compostos orgânicos e inorgânicos, enquanto a temperatura contribui com seca da região, por otimizar a evaporação da humidade do solo (Lançoni *et al.*, 2013; Pacchioni *et al.*, 2014).

Apesar da temperatura média do semiárido variar entre 25°C e 30°C pode atingir valores entre 52°C e 57°C nos primeiros 10 cm de profundidade do solo nos períodos de estiagem, e temperaturas entre 31°C e 36°C nos períodos de chuva intensa. Especula-se, assim, que em solos do semiárido a pressão seletiva tem favorecido a manutenção de organismos resistentes às variações ambientais, principalmente aos fatores climáticos (Görlach-Lira e Coutinho, 2007; Lançoni *et al.*, 2013).

A aclimação e as respostas a mudanças ambientais contribuem a rápida adaptação da microbiota, que apesar de gerar altos custos fisiológicos e mudanças na comunidade, tem gerado grande interesse científico, sobretudo às respostas metabólicas, principalmente pelo fato de muitos recursos genéticos de microrganismos não terem sido explorados (Ros *et al.*, 2006; Schimel *et al.*, 2007; Kügler *et al.*, 2015).

A microbiota contém possivelmente uma diversidade metabólica semelhante ou tão grande quanto à genética, e, conseqüentemente, é um reservatório rico em moléculas biologicamente ativas, sendo assim grandes alvos à bioprospecção (Horner-Devine *et al.*, 2004; Charlop-Powers *et al.*, 2014). A bioprospecção resume-se na busca de recursos metabólicos e genéticos para prospecção de novos produtos ou processos com finalidade comercial (Cardoso, 2013), ou ainda, com o desenvolvimento de pesquisas voltadas à recursos genéticos ou produtos derivados para explorações industriais, farmacêuticas, cosméticas ou alimentares (Azevedo, 2003).

Algumas das moléculas bioativas extraídas de microrganismos tem aplicação industrial e tecnológica, como enzimas, polímeros, biosensores, antibióticos, compostos citotóxicos viáveis à supressão de cancros, pigmentos para indústria alimentícia e têxtil, e outros (Charlop-Powers *et al.*, 2015). Esses metabólitos provem de vias ou estruturas pequenas, como peptídeos ribossomais ou não ribossomais, terpenos e outros (Charlop-Powers *et al.*, 2015). Assim, a

identificação específica, aliada a identificação intraespecífica, pode direcionar as pesquisas e explorações metabólicas, constituindo uma alternativa para desenvolvimento econômico e social da região.

Para utilização biotecnológica, em geral, faz-se necessária a identificação bacteriana, seja por metodologias tradicionais, referentes a microbiologia clássica, ou moleculares (Hornink, 2015). Os métodos tradicionais utilizam meios bioquímicos e morfológicos na identificação taxonômica, enquanto os métodos moleculares incluem diversas técnicas, como análise plasmidial, eletroforese de enzimas multilocus (MLEE), reação de amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), e a mais comum, a amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) (Healy *et al.*, 2005).

A principal metodologia molecular para identificação bacteriana é a o sequenciamento do gene que codifica o 16S. A descoberta da utilização desse gene para identificar organismos, gerou rapidamente a aceitação por microbiologistas, para estudos voltados a ecologia de microrganismos, fazendo-o ser largamente utilizado, principalmente para estimativas de riqueza de espécies (Pereira, 2002; Torsvik e Øvreås, 2002; Janssen, 2006; Case *et al.*, 2007).

Apesar de ser anteriormente classificado como “padrão ouro”, foi observada uma limitação na utilização do gene que codifica 16S, principalmente por ser codificado de forma completa apenas utilizando-se *primers* segmentados para cerca de nove regiões desse gene (Schloss *et al.*, 2011). Além disso tem sido relatada a ocorrência de cópias desse gene em bactérias e em *Archaea*, encontrando-se de 1 a 15 cópias do gene 16S rRNA em bactérias (SUN *et al.*, 2013). Apesar disso a metodologia tem sido utilizada principalmente na ecologia microbiana, na biotecnologia e na descoberta de novos patógenos, principalmente por ser uma metodologia mais barata que o sequenciamento metagenômico (Schloss *et al.*, 2011).

O uso do 16S rRNA como marcador para identificação específica, tem contribuído amplamente para análise de comunidades em diversos ambientes (Case *et al.*, 2007). No solo, a utilização do 16S rRNA, tem concluído a redundância de alguns grupos, dentre eles: alfa, beta e gama *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, que compõem até 92% das bibliotecas de bactérias edáficas (Janssen, 2006).

Novos métodos baseados em DNA, tem surgido para se identificar e classificar microrganismos em investigações epidemiológicas, taxonômicas e filogenéticas, demonstrando que genomas de grupos divergentes de procariotos têm apresentado diversas classes de sequências repetidas de DNA, compondo cerca de 5% do genoma microbiano, com regiões constituídas de um mesmo tipo de nucleotídeos distribuídas de forma intercalada no genoma (Versalovic e Lupski, 1998; Spigaglia e Mastrantonio, 2003; Olivindo, 2007).

Esses elementos se encontram em regiões intergênicas e extragênicas do genoma com função atualmente desconhecida (Ussery *et al.*, 2004), e são descritas como relativamente curtas, contendo, em geral, menos de 500pb, mas podendo variar de 15pb a centenas, como nos elementos repetitivos específicos (RLEP). Entretanto, outros autores descrevem essas sequencias numa variável de 30 a 400pb em genomas eucarióticos e procarióticos (Sadowsky e Hur, 1998; Versalovic e Lupski, 1998; Kang e Dunne, 2003; Ishii e Sadowsky, 2009).

A tipagem genética desses elementos repetitivos, através da PCR, mostrou que estas regiões são distribuídas de forma aparentemente aleatória, entretanto seu arranjo parece ser conservado em cepas relacionadas, uma vez que uma população (cepa, estirpe ou linhagem) microbiana compõe grupos de células derivadas por divisão celular de uma célula inicial, ou seja, são parte da mesma cadeia de transmissão, resultando assim em padrões específicos e únicos, para gêneros, espécies e subespécie (Del Vecchio *et al.*, 1995; Sadowsky *et al.*, 1996; Louws *et al.*, 1998; Chapaval *et al.*, 2006; Madigan *et al.*, 2010). As especificidades dos padrões genéticos são resultantes de variação em tamanho, grau de conservação e número de cópias desses elementos repetitivos, que possibilitam análises populacionais a partir dos padrões de cepas (Sadowsky e Hur, 1998; Versalovic e Lupski, 1998).

A técnica da rep-PCR ou PCR de elementos palindrômicos repetitivos, consiste em um dos métodos para tipagem intraespecífica e análise da similaridade parental bacteriana, que utiliza-se de iniciadores para a amplificação de fragmentos de tamanhos distintos, das sequencias repetitivas do DNA, resultando em impressões genéticas, após a análise em eletroforese (Schneider e De Bruijn, 1996; Masco *et al.*, 2003; Spigaglia e Mastrantonio, 2003).

A rep-PCR é uma técnica de identificação considerada altamente confiável, reprodutível, rápida, sensível e específica, o que resulta em uma economia de reprodução e investimento (Del Vecchio *et al.*, 1995; Gevers *et al.*, 2001; Dos Anjos Borges *et al.*, 2003; Chapaval *et al.*, 2006). Em que a obtenção dos padrões genéticos ou *fingerprinting*, independe das condições de crescimento, devido a estabilidade dos REP, observada em diversas gerações de cultivo (Healy *et al.*, 2005).

Inicialmente descritos como sequencias potencialmente regulatórias dentro de regiões não traduzidas de *operons*, as sequencias ou elementos extragênicos palindrômicos repetitivos (REP), foram primeiramente detectados em *Escherichia coli* e outras enterobactérias, entretanto, são encontrados amplamente distribuídos em diversos membros da diversidade bacteriana. Têm sido utilizados em diversos estudos com iniciadores baseados nos REPs, sobretudo, politrinucleótídeos de sequencias curtas, como (GTG)₅, BOX, ERIC e REP,

sequencias evolutivamente conservadas entre espécies (Versalovic *et al.*, 1991; Schneider e De Bruijn, 1996; Olive e Bean, 1999; Masco *et al.*, 2003; Tobes e Ramos, 2005)

O elemento repetitivo (GTG)₅, quando comparado a outras sequencias como REP1R e REP2, é mais discriminatório e resulta em padrões de bandas mais complexos. Entretanto, tem sido pouco utilizado como primer para resultados de *fingerprinting* por rep-PCR, mesmo tendo sido mostrado em diversos grupos, como *Klebsiella*, *Salmonella*, *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Enterococcus* e *Streptococcus* (Gevers *et al.*, 2001; Braem *et al.*, 2011; Ryberg *et al.*, 2011; Kathleen *et al.*, 2014).

Os avanços nas técnicas moleculares têm permitido estudos mais detalhados em escala de tempo menor, sobre a diversidade e biogeografia da microbiota, e conseqüentemente para conhecimento e manutenção dos ecossistemas. Entretanto, apesar da importância biológica, a diversidade microbiana de solos ainda é pouco conhecida, sobretudo de ambientes semiáridos. Assim, o conhecimento da comunidade bacteriana edáfica pode não somente contribuir ao conhecimento taxonômico da microbiota regional, como à conservação e preservação de solos, e ainda, a estudos biotecnológicos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo objetivou identificar bactérias edáficas da RPPN Fazenda Tamanduá inserida no semiárido paraibano.

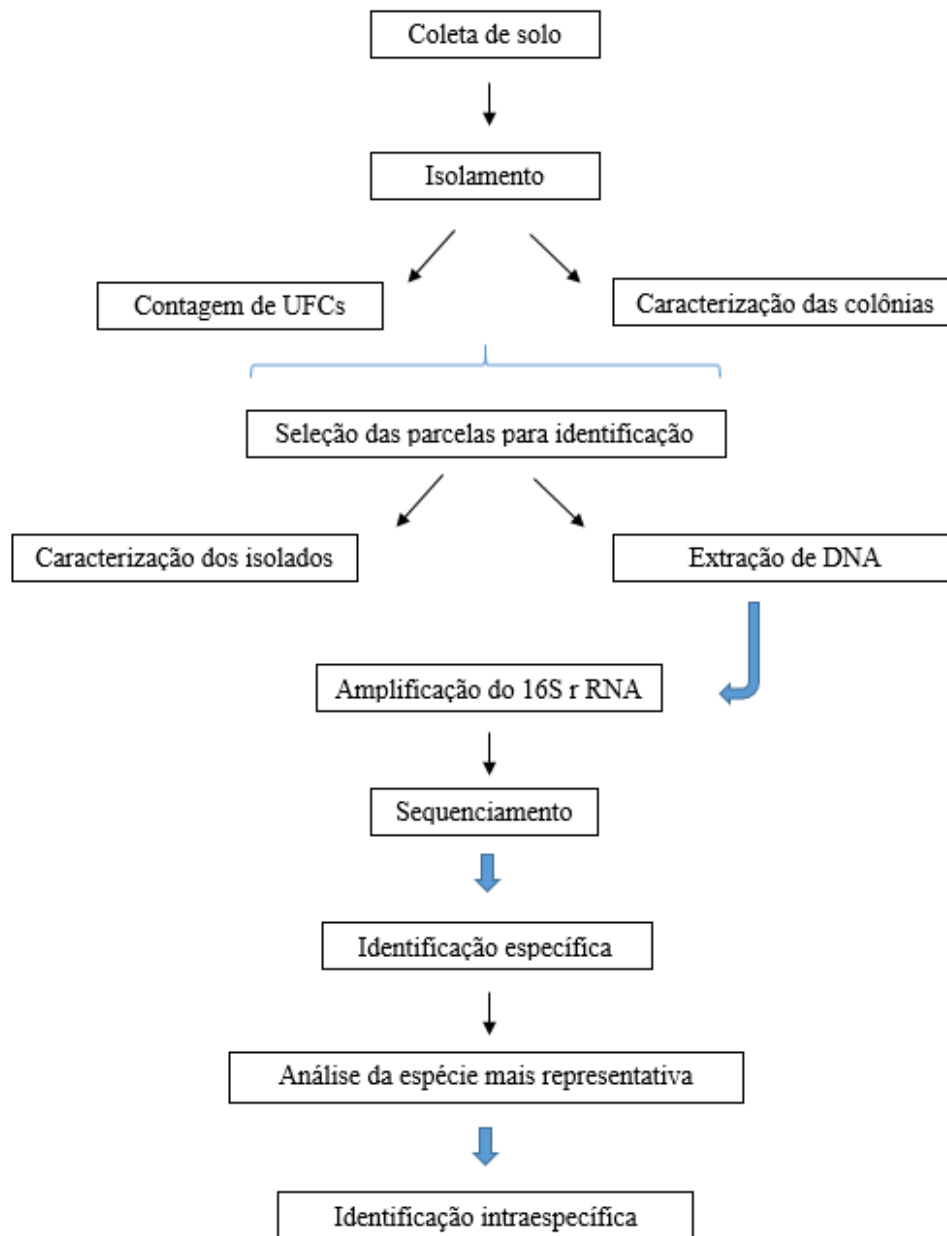
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- A) Criar uma coleção e realizar um inventário taxonômico de bactérias do solo da Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Fazenda Tamanduá.

- B) Avaliar a variação intra-específica da principal espécie bacteriana identificada.

3. METODOLOGIA

Figura 1: Fluxograma resumido das metodologias adotadas para desenvolvimento do estudo



Acervo GDBM

3.1. ÁREA DE TRABALHO

As coletas do solo amostrada no presente estudo foram obtidas na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Fazenda Tamanduá, situada no município de Santa Terezinha-PB, nordeste do Brasil, sobre as coordenadas 7° 2' 20" S e 37° 26' 43" W. Localizada na

Mesorregião do Sertão Paraibano, na Região Fisiográfica Sertão de Piranhas ou Sertão das Espinharas, a 18km da cidade de Patos e 320km da capital, e aproximadamente a 300 metros sobre o nível do mar (Telino-Júnior *et al.*, 2010; Anselmo *et al.*, 2014).

Essa região está disposta na Depressão Sertaneja Setentrional com afloramentos rochosos e fortes ondulações topográficas. Os solos típicos são resultantes do intemperismo de rochas cristalinas, em geral dos tipos Neossolos Litólicos e Luvisolos, e ainda, associação desses (Beltrão *et al.*, 2005; De Andrade *et al.*, 2008; Anselmo *et al.*, 2014).

A área é classificada dentro do clima tropical semiárido (Bsh), com duas estações definidas, a de estiagem e a estação chuvosa, numa precipitação média de 600mm anuais, mais com variações, em geral, abaixo de 1000mm anuais. Enquanto a temperatura varia numa faixa de 23°C a 30°C, entre diurno e noturno, com picos de elevação, sobretudo nos períodos de estiagem (Beltrão *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006; Lisboa *et al.*, 2013).

A RPPN Fazenda Tamanduá, criada em julho de 1998, está inserida na área comercial Fazenda Tamanduá, pertencente a Mocó Agropecuária Ltda. Dos 3.073ha da fazenda, mais de 900ha são destinados a preservação, com 614ha de reserva legal e 325ha destinadas a RPPN. A região não é explorada a cerca de 25 anos, e aponta uma vegetação típica de Caatinga, caracterizada como arbustiva-arbórea fechada, inserida na bacia hidrográfica do rio piranhas, entretanto presente entre os rios Espinharas e Piancó, ambos intermitentes, (Alves *et al.*, 2006; De Andrade *et al.*, 2008; Telino-Júnior *et al.*, 2010; Lisboa *et al.*, 2013).

3.2. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

A amostragem de solo foi feita de forma aleatória em 10 parcelas de 100m², distanciadas por pelo menos 250m, sobrepostas a uma grade de 100 pontos em mapa do Google Earth Pro (licença: 8-0668000001302). A coleta foi feita no ponto central de cada parcela e foram amostradas quatro subamostras, posteriormente homogeneizadas para formar uma amostra composta. O solo foi coletado na camada entre 0 - 20cm, conservado em sacos plásticos esterilizados e transportadas a 4°C (Beltrão, 2014).

O isolamento seguiu metodologia de enriquecimento segundo Soares Jr. e colaboradores (2012) (Figura 2). Onde para avaliar a população cultivável de bactérias foi utilizada uma alíquota de 1mL de cada amostra e diluições seriadas (Figura 3), realizadas na proporção 1:10. Cem microlitros das diluições 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ foram inoculados em triplicata, em meio de cultura TSB com ágar a 1,5% (Soares Jr. *et al.*, 2012), acrescido de cicloheximida (50mg/mL) a 37°C por 48h, selecionando-se a diluição 10⁻⁶ para prosseguir o isolamento. As colônias

selecionadas foram purificadas por esgotamentos e mantidas em suspensões de glicerol estéril (20%) a -20°C.

Figura 2: Metodologia de isolamento com enriquecimento (Soares Jr. *et al.*, 2012).

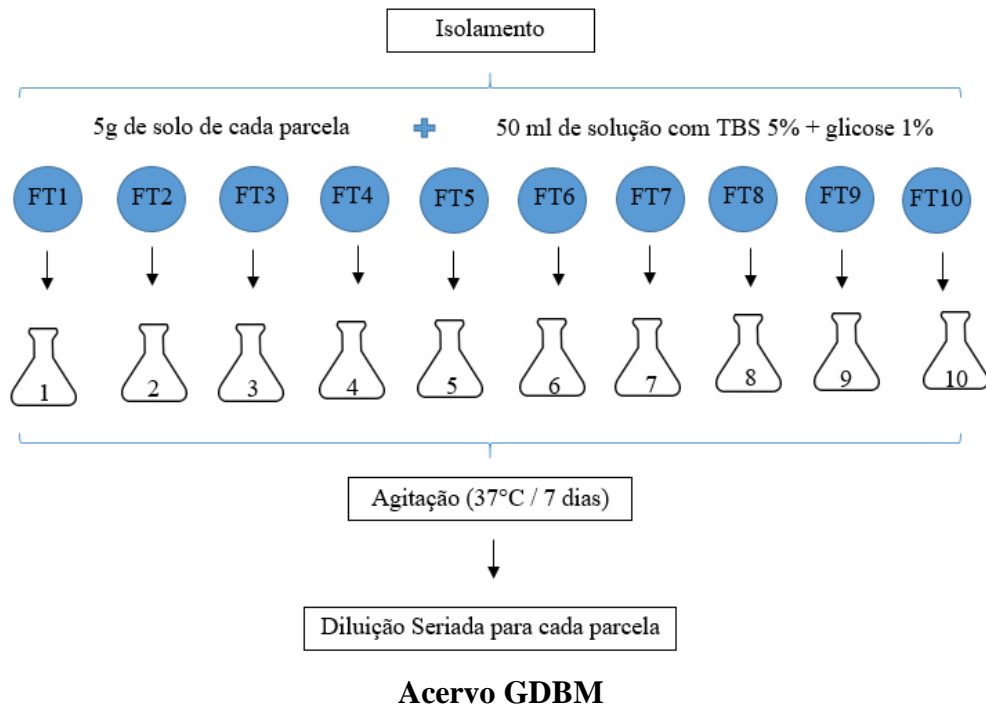
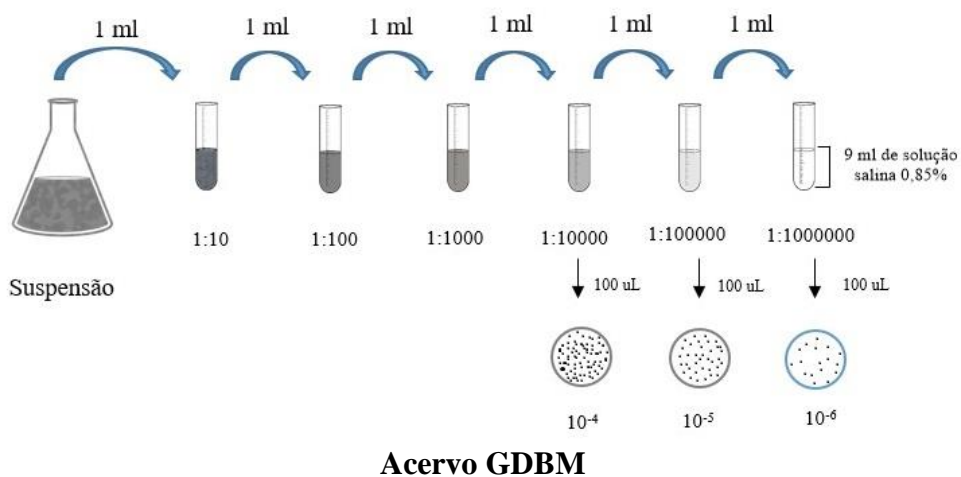


Figura 3: Diluição seriada e inoculação de bactérias em meio sólido



Os valores absolutos de abundância e densidade populacional foram obtidos a partir da contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nas 10 parcelas, resultantes das médias das triplicatas. A contagem de UFCs foi feita a partir da fórmula:

$$\text{UFC}(\text{g}^{-1}) = \text{número de colônias} / (\text{diluição da amostra} * \text{volume inoculado})$$

Foram então obtidas de forma aleatória, quatro parcelas para identificação molecular e caracterização morfológica, sobre os aspectos de forma, coloração, tamanho, e textura (visual), a fim de se obter dados sobre a diversidade morfológica bacteriana de cada parcela.

3.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

3.3.1. Extração de DNA

As bactérias foram cultivadas em tubos de plástico de 15ml, do tipo falcon, contendo 10mL de meio de cultura a 37°C e utilizadas para extração de DNA, a partir da metodologia modificada, descrita por Moreira e colaboradores (2005).

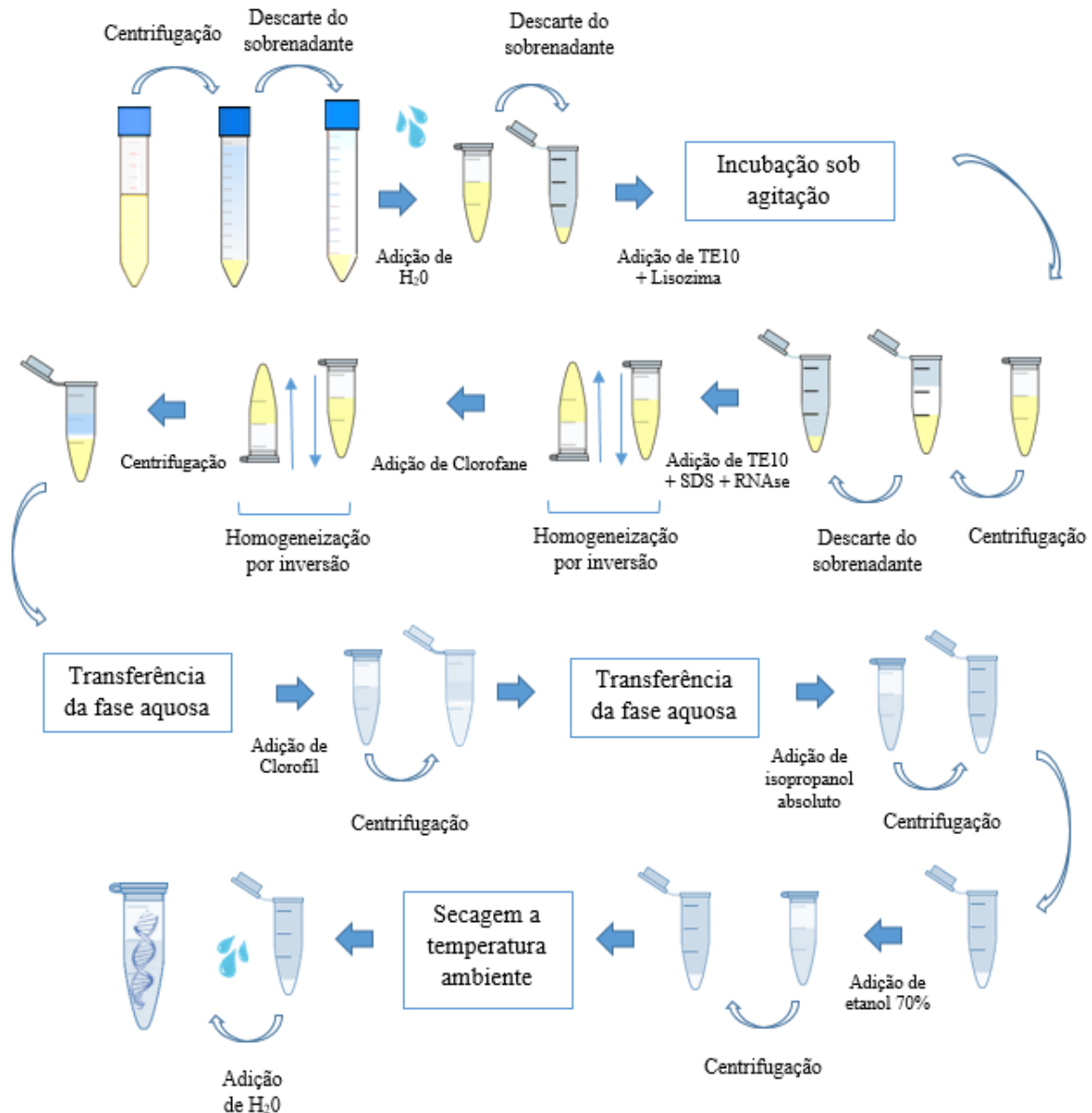
O cultivo foi centrifugado a 4000 rpm por 10min, desprezando-se o sobrenadante. O *pellet* foi ressuscitado em 1mL de água *milli Q*, transferido para um microtubo e centrifugado a 4000 rpm por 10min. O sobrenadante foi descartado e no microtubo foi adicionado 1mL de TE10 (Tampão: Tris 50mM, EDTA 10mM, pH 8,0) e lisozima (10mg/mL), que após ressuspensão foi colocado sob agitação por 1h a 37°C. Centrifugou-se a 4000 rpm por 10min e então desprezou-se o sobrenadante.

A segunda etapa segue a ressuspensão do precipitado com 540µL de TE10, 60µL de SDS a 10% e 3µL de RNase (20mg/mL), homogeneizado por inversão a 10 min até que a suspensão fique translúcida. Foram acrescentados 600µL de clorofane (solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção de 25:24:1) homogeneizado por inversão a 5 min.

A suspensão foi centrifugada a 14000 rpm por 10min, com a separação da fase superior aquosa, que foi transferida para um outro microtubo. Fez-se o acréscimo de 600µL de clorofil (solução de clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção de 24:1) e a suspensão foi centrifugada a 14000 rpm por 10min. A fase superior aquosa foi novamente transferida para um outro microtubo e o DNA foi precipitado em 600µL de isopropanol (1vol) absoluto gelado, numa centrifugação a 14000 rpm por 30min a 4°C.

O precipitado foi em seguida ressuscitado em 500µL de etanol 70% e novamente centrifugado a 14000 rpm por 10min a 4°C, seco a temperatura ambiente. Por fim, foi feita a ressuspensão do DNA com 100µL de água ultrapura estéril e armazenado a -20°C.

Figura 4: Metodologia de extração de DNA dos isolados



Acervo GDBM

3.3.2. Sequenciamento

A região interna do gene 16S do rRNA foi amplificada utilizando os *primers* pA (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e pH (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3') (Thompson *et al.*, 2001). As reações de amplificação foram preparadas para o volume final de 50µL contendo 0,5µM de cada iniciador, 0,2mM de cada dNTP, tampão de reação (1X) com 1,5mM de MgCl² e 1U/µL de Taq DNA polimerase.

As amplificações seguiram a programação de: 1 ciclo de desnaturação de 5min à 95°C; 3 ciclos de desnaturação à 95°C por 1min; anelamento à 46°C por 2'15''; extensão à 72°C por

1' 15''; 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 35min; anelamento à 46°C por 1'15''; extensão à 72°C por 1'15''; e extensão final à 72°C por 7min.

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1.5% a 5h/100V em tampão TBE 0,5X, corados em *SIBER*, e a banda correspondente foi purificada com o *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen)*, conforme instruções. E então enviados para sequenciamento realizado no *ABI Prism Sequencer 3500 (Applied Biosystems, USA)*.

As sequências resultantes foram analisadas usando o pacote de *softwares* STADEN 1.6, com as ferramentas *Pregap4* e *Gap4*, posteriormente submetidas à busca de similaridade no banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI), utilizando a ferramenta *Blast N* (Altschul *et al.*, 1997), e ao *Ribosomal Database Project (RDP)*, assumindo similaridades superiores a 97% para identificação específica, para o gene rDNA16S (Gevers *et al.*, 2005).

Quando não assumidos os níveis determinados de similaridade, as sequências foram submetidas a análise filogenética com as sequências das linhagens tipo, indicadas na *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (Euzéby, 1997), e obtidas no NCBI. O alinhamento múltiplo dessas sequências foi realizado a partir do programa *CLUSTALw* (Thompson *et al.*, 1994) e visualizado através do programa MEGA 6.

O programa MEGA 6 foi utilizado para construção e visualização das árvores filogenéticas geradas (Tamura *et al.*, 2007). Os agrupamentos baseados nas inferências filogenéticas foram construídos aplicando o algoritmo *Neighbour-Joining* (Saitou e Nei, 1987) com testes estatísticos *bootstrap* com 2000 replicações.

3.3.3. rep-PCR

As reações de amplificação dos elementos palindrômicos repetitivos (REP) do DNA bacteriano foram realizadas a partir da complementariedade do primer (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGT-3'), seguindo metodologia de Lucena e colaboradores (2010), que segue modificações de Berthier, 2001. Em volume final de 25µL contendo 0,2pmol de cada iniciador, 0,2mM de cada dNTP, tampão de reação (1X) com 3mM de MgCl₂, 0,025µg/µL BSA e 1U/µL de Taq DNA polimerase.

A amplificação foi programada para 1 ciclo de desnaturação de 7 minutos à 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 1 minuto, anelamento à 40°C por 1 minuto, extensão à 65°C por 8 minutos, e extensão final à 65°C por 16 minutos (Versalovic *et al.*, 1994).

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1.5% submetidos a 5h/100V em tampão TBE 0,5X, corados em *SIBER*, visualizados em transiluminador ultravioleta.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE DE ABUNDANCIA E DENSIDADE DE BACTÉRIAS

Considerando os valores absolutos, os solos das parcelas da Fazenda Tamanduá apresentaram abundância de bactérias na grandeza de 10^8 e 10^9 UFC g^{-1} . A contagem de bactérias mostrou ainda, que a parcela 5 apresentou a maior abundância de bactérias cultiváveis, enquanto a parcela 7 apresentou a menor abundância (Tabela 1).

Os valores da contagem de unidades formadoras de colônias da Fazenda Tamanduá são considerados maiores diante de outros estudos com microrganismos em regiões de semiárido, que mostraram contagens entre 10^3 e 10^6 UFC g^{-1} (Gorlach-Lira e Coutinho, 2007; Lima *et al.*, 2014).

A maior abundância e densidade de bactérias do trabalho atual, em relação aos trabalhos de Gorlach-Lira e Coutinho (2007), e Lima e colaboradores (2014) pode ter ocorrido não só pelas localidades amostrais serem em estados distintos, como principalmente pelo método de isolamento utilizado. O método de enriquecimento foi mostrado como eficiente para bactérias de ambientes adversos, sejam organismos psicrófilos, mesófilos ou termófilos, favorável ao crescimento de actinobactérias, bactérias formadoras de esporos, bactérias com fluorescências e outras, enquanto os demais métodos poder ter sido mais selecionadores (Soares Jr. *et al.*, 2012).

Tabela 1: Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das parcelas amostradas na Fazenda Tamanduá.

Parcela	Médias de abundância da Fazenda Tamanduá
1	$1,32 \times 10^9$
5	$3,643 \times 10^9$
7	$5,26 \times 10^8$
9	$2,976 \times 10^9$

4.2. ANÁLISE MORFOLÓGICA DE BACTÉRIAS NA FAZENDA TAMANDUÁ

Cento e vinte bactérias foram caracterizados morfológicamente quanto a coloração, textura ou forma, resultando em 17 morfologias. E apresentaram coloração entre branco e tons de amarelo, textura lisa e rugosa, opaca e brilhosa, variando também quanto ao tamanho. Resultando em oito morfotipos na parcela 1, quatro morfotipos na parcela 5, cinco morfotipos na parcela 7 e seis morfotipos na parcela 9. Assim, quanto a diversidade morfológica a parcela 1 foi a de maior variedade, enquanto a parcela 5 apresentou a menor diversidade de morfotipos.

Cerca de 70,83% dos isoladas apresentaram coloração amarela, possivelmente pela produção de pigmentos. A produção de pigmentos é comum em microrganismos de solo e a tonalidade amarela indica uma microbiota especializada frente à radiação ultravioleta, uma vez que esses pigmentos são carotenoides com estruturas isoprenóide que possibilitam a absorção das ondas visíveis de radiação (Moritz, 2005; Kavamura *et al.*, 2013; Kampe *et al.*, 2015).

Pigmentos de coloração amarela têm sido investigados para fins biotecnológicos em bactérias de diversos gêneros, e alguns pigmentos já foram descritos como é o caso da sarcinaxantina e o carotenoide C50 dihidroxi produzidos por *Micrococcus luteus* (Surekha *et al.*, 2016). A frequência de pigmentos amarelos na Fazenda Tamanduá indica um alto potencial de bactérias produtoras de pigmentos para utilização biotecnológica, bem como pode indicar que a microbiota tem se especializado em resposta a alta incidência de radiação.

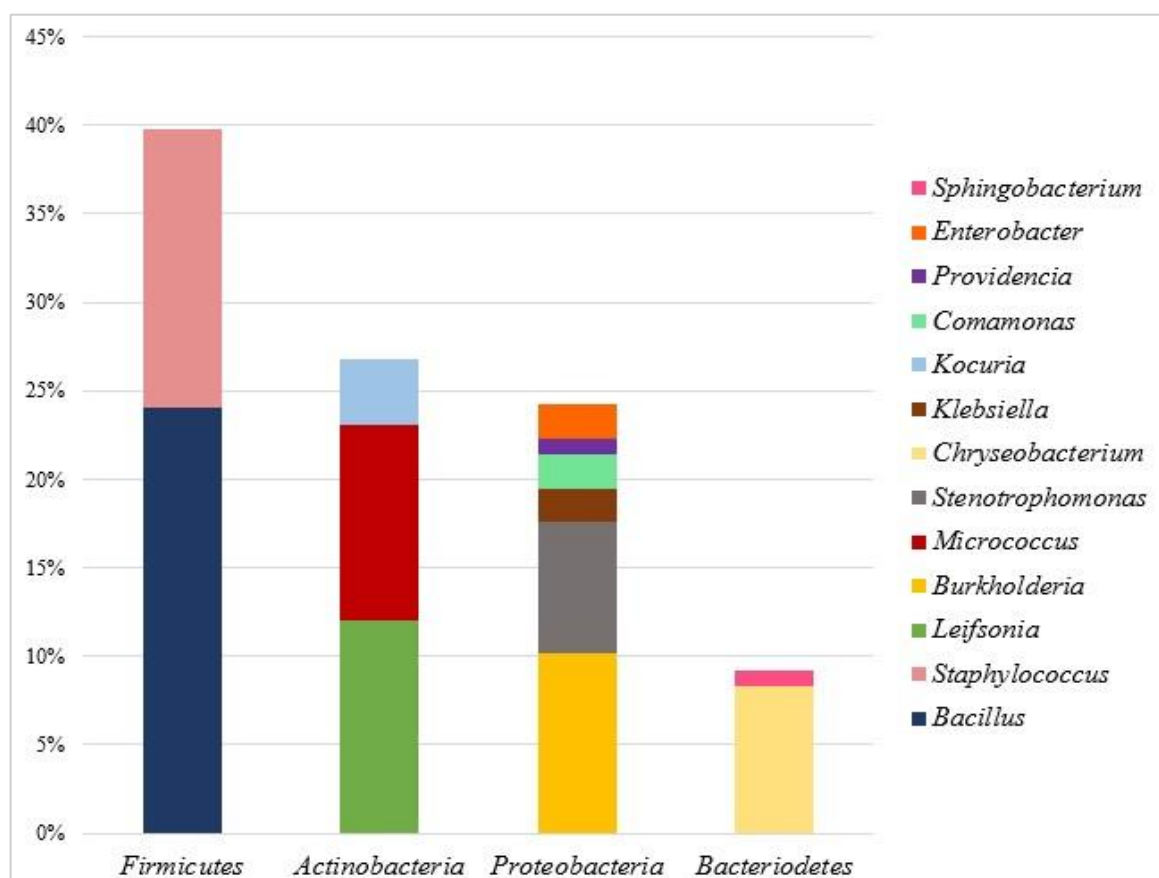
4.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DA FAZENDA TAMANDUÁ

Os isolados bacterianos identificados nas quatro parcelas estudadas estão distribuídos em quatro *phylum*: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Sendo a maior abundância bacteriana, com 38,1%, pertencente ao grupo *Firmicutes* (Figura 1), seguido por *Actinobacteria* com 25,7% de abundância, *Proteobacteria* com 23% e *Bacteroidetes* com 8,8%, enquanto 4,4% foram bactérias não identificadas.

Quanto ao gênero os isolados foram agrupados em 13 grupos, sendo: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kocuria*, *Leifsonia*, *Micrococcus*, *Providencia*, *Sphingobacterium*, *Staphylococcus* e *Stenotrophomonas*. Onde *Bacillus* representou 24,1% da abundância dos isolados identificados, sendo o gênero de maior representatividade (Figura 1).

Cerca de 46,15% dos gêneros identificados são componentes de *Proteobacteria*, 23,07% representam *Actinobacteria*, e os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* correspondem a 15,38%, cada. E assim, o filo *Proteobacteria* apresentou a maior diversidade de gêneros, seguida por *Actinobacteria*. Essa ocorrência está relacionada à redundância de gêneros, onde espécies distintas pertenceram a um mesmo gênero como é o caso de espécies de *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Comamonas* e *Chryseobacterium*.

Figura 5: Representatividade dos filos na Fazenda Tamanduá quanto a distribuição de gêneros identificados.



Acervo GDBM

Outros trabalhos sobre ecologia e composição bacteriana do solo tem demonstrado que os filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* são alguns dos principais representantes do solo de ecossistemas mundiais, assim como observado no solo da Fazenda Tamanduá (Buckley e Schmidt, 2003; Janssen *et al.*, 2006). Desses grupos, estudos têm destacado a representatividade de *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, mostrados também como os filos mais abundantes em solos de Cerrado (Buckley e Schmidt, 2003; Lira, 2012).

Entretanto, observa-se que no solo das parcelas estudadas da Fazenda Tamanduá o grupo de maior representatividade foi *Firmicutes*, com abundância do gênero *Bacillus* (Figura 1).

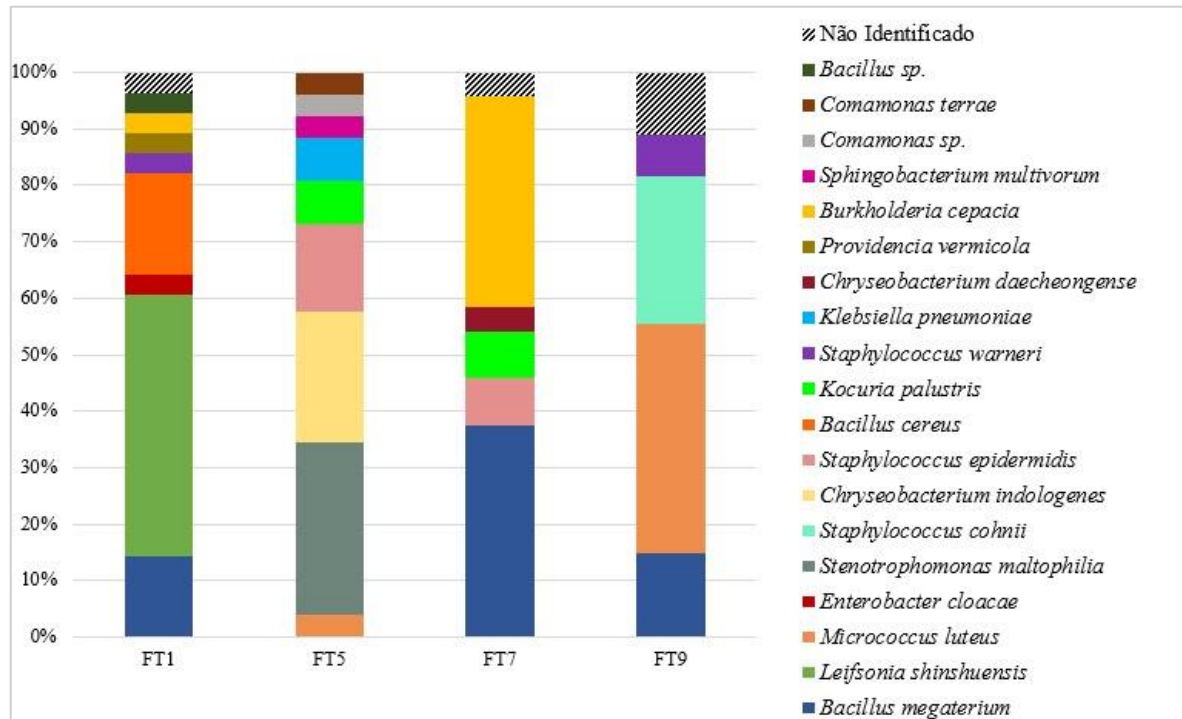
O estudo realizado por Soares Jr. e colaboradores (2012) com bactérias celulolíticas da Caatinga na região de Canindé (Ceará) apresentou uma diversidade muito similar, identificando representantes entre os filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Nessa região o filo de maior abundância também foi *Firmicutes*, representando principalmente pelo grupo *Bacillus*. Essa representatividade de *Firmicutes* também foi mostrada por Borneman e colaboradores (1996) (*apud* Silveira, 2004) em solo da Amazônia, com o gênero *Bacillus* sendo também, o principal representante.

A maior representatividade de *Bacillus* também foi exibida por Kavamura e colaboradores (2013) em rizosfera de Mandacaru na Caatinga, mostrando que sua ocorrência é maior em períodos de seca que em períodos chuvosos, provavelmente devido à formação de endósporos. Assim, a maior abundância desse gênero na Fazenda Tamanduá pode ter ocorrido devido a coleta do solo ter sido realizada durante o período de estiagem, ou seja, o período de seca.

4.3.1. Análise da abundância e diversidade de espécies

Dos isolados bacterianos estudados foram identificadas vinte e três espécies, são elas: *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia vermicola*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sp.*, *Comamonas terrae* e *Comamonas sp.*, pertencentes ao filo *Proteobacteria*; *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus sp.*, pertencentes a *Firmicutes*; *Micrococcus luteus*, *Leifsonia shinshuensis* e *Kocuria palustris*, pertencentes ao filo *Actinobacteria*; e as espécies *Chryseobacterium indologenes*, *Chryseobacterium daecheongense*, *Chryseobacterium joostei* e *Sphingobacterium multivorum* do filo *Bacteroidetes*.

Figura 6: Distribuição dos isolados bacterianos identificados na Fazenda Tamanduá (FT1 – parcela 1; FT5 – parcela 5; FT7 – parcela 7; FT9 – parcela 9)



Acervo GDBM

Parte das parcelas estudadas apresentaram predominância de uma espécie como na FT1 que 46,4% dos isolados foram identificados como *Leifsonia shinshuensis*, na FT5 houve predominância de 27,6% de *Stenotrophomonas maltophilia*, e a FT9 foi representada por 39,3% pela espécie predominante *Micrococcus luteus* (Figura 6). A FT7 foi a única parcela que não apresentou uma espécie predominante, com as espécies *Burkholderia cepacia* e *Bacillus megaterium* apresentando a maior abundância, ambas representando 32,1% dos isolados da parcela (Figura 6).

A análise das parcelas mostra assim que existem grupos dominantes, de forma que um ou poucos grupos são mais abundantes enquanto os demais são pouco representados. Essa equitabilidade foi mostrada por Souto e colaboradores (2008) como padrão ecológico de microrganismos edáficos. Assim como, Roesch e colaboradores (2007) mostraram que mesmo observando diferença em diversidade nas amostras, houve dominância de algumas espécies, com a maior abundância de bactérias pertencentes aos grupos *Proteobacteria* e *Firmicutes*.

Tabela 2: Características físico-químicas do solo das parcelas da Fazenda Tamanduá

(P – Fósforo, Ca²⁺ – Cálcio, Mg²⁺- Magnésio, K⁺- Potássio, Na⁺- Sódio, SB- Soma de Bases, H⁺+Al³⁺ - acidez potencial, Al³⁺ - Alumínio, CTC - capacidade de troca de cátions V- % de Saturação de base, pH- Potencial de hidrogênio, MO- Matéria Orgânica, Den – Densidade Vegetal, Areia, Argila, TS- Textura do solo)

Variáveis	FT1	FT5	FT7	FT9
P	1,10	8,80	37,30	6,60
Ca²⁺	5,00	7,20	5,30	3,20
Mg²⁺	3,00	2,80	2,70	1,80
K⁺	0,22	0,32	0,30	0,36
Na⁺	0,78	0,83	0,87	0,91
SB	9,00	11,15	9,17	6,27
H⁺+Al³⁺	1,88	1,60	1,80	2,20
Al³⁺	0,20	0,20	0,30	0,30
CTC	10,80	12,70	11,00	8,50
V%	83,30	87,40	83,60	74,00
pH	6,90	6,40	6,50	6,10
MO	27,57	31,71	28,95	26,88
Den	2500,00	3400,00	4800,00	4300,00
Areia	739,00	739,00	879,00	879,00
Argila	156,00	96,00	56,00	56,00
Silte	105,00	165,00	65,00	65,00
TS	Franco arenoso	Franco arenoso	Areia franca	Areia franca

Dados: Beltrão (2014)

As espécies identificadas como predominantes nas parcelas parecem ter sido favorecidas por características do solo. A densidade da vegetação pode ter influenciado principalmente a ocorrências de *Micrococcus luteus* e *Leifsonia shishuensis*, uma vez que espécies dos gêneros *Micrococcus* e *Leifsonia* são encontrados comumente em solo em associações com plantas, onde *Leifsonia spp.* são em geral comensais de plantas (Hao *et al.*, 2008; Silva, 2012).

Silva (2012), mostrou que em solos do Cerrado sobre baixa pluviosidade foram identificadas espécies de *Leifsonia*, com maior abundancia de *L. shishuensis*, também identificada por Hao e colaboradores (2008) em solo de rizosfera de regiões subtropicais e

temperadas na China. Enquanto *Micrococcus luteus*, foi relatada em serapilheira de Mata Atlântica, ressaltando sua associação a plantas (Gonçalves, 2006). Essa espécie tem sido investigada ainda, quanto o seu papel na remediação de solo, onde Montealegre (2014), mostrou ocorrência de *M. luteus* em solos em processo de biorremediação na Ilha da Trindade, Brasil.

A densidade de vegetação somada a outras condições da Fazenda Tamanduá pode ter favorecido ainda a alta deposição de matéria orgânica, principalmente na parcela 5 (parcela com maior aporte orgânico). De forma a ter favorecido a ocorrência da espécie *Stenotrophomonas maltophilia*, representante do grupo gama *Proteobacteria*, uma vez que essas condições são propícias ao sucesso de indivíduos desses grupamentos, conforme indica Zilli e colaboradores (2003), mostrando que bactérias do grupo gama *Proteobacteria* são identificadas em solos de alta concentração nutricional, bem como, Giri e colaboradores (2005) indicam que indivíduos do filo *Proteobacteria* foram relatados com maior ocorrência em solo de floresta, solos geralmente de riqueza orgânica.

Enquanto a predominância das espécies *B. cepacia* e *Bacillus megaterium* na parcela 7 pode ter ocorrido devido à alta concentração de fósforo na parcela, uma vez que essas são espécies conhecidas pela solubilização de fosfatos e favorecimento do crescimento vegetal (Torres e Prager, 2012; Kumar *et al.*, 2014; Massenssini *et al.*, 2016). As parcelas variaram entre 1.10 e 8.80 mg.dm³ de P, enquanto a parcela 7 mostrou uma concentração de 37,30 mg.dm³ de P (Tabela 2), possivelmente contribuindo a abundância de bactérias solubilizadoras desse elemento.

4.4. ANÁLISE DA ESPÉCIE DE MAIOR REPRESENTATIVIDADE DA FAZENDA TAMANDUÁ

Apesar das parcelas apresentarem espécies do grupo das *Actinobacteria* e *Proteobacteria* como espécies predominantes, a espécie de maior representatividade geral nas parcelas estudadas foi *Bacillus megaterium*, representando 15,04% de todos os isolados identificados. Esta foi a única espécie com ocorrência significativa em mais de uma parcela, identificada do solo da FT1, FT7 e FT9, com 53% dos isolados identificados como *B. megaterium* ocorrendo na parcela 7 (Figura 2).

Bacillus megaterium também foi mostrada no estudo de Kavamura e colaboradores (2013 (b)), tendo similaridade entre 98,35% a 100% com sequências de isolados encontrados em rizosfera, associada ao crescimento de cactos em ambientes com pouca disponibilidade de

água na região Semiárida do Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia, Paraíba e Piauí, mostrando-se importante a plantas típicas do Semiárido e conseqüentemente à seu sucesso e preservação.

Assim como as demais espécies de bactérias, *B. megaterium* pode ter tido sua distribuição e abundancia influenciada pelas condições de solo. Essa inferência leva a acreditar que a espécie não ocorreu na FT5 por fatores como saturação de bases (ou proporção de cátions básicos trocáveis), textura do solo, formação de agregados e concentração de nutrientes, por exemplo.

Os dados mostraram que o solo da Fazenda Tamanduá foi atribuído como Eutrófico segundo a classificação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), com proporção de cátions básicos trocáveis (V%) acima de 50% (Tabela 2). A V% está ligada aos processos de troca na ionosfera e conseqüentemente a formação dos colóides orgânicos e inorgânicos do solo. Esses colóides por sua vez, regulados pelo pH, influenciam a adesão de bactérias as partículas do solo, formando os agregados (Stamford *et al.*, 2005).

Como a parcela 5 apresentou a maior porcentagem de saturação por bases, acima de 80% (Tabela 2), mostrando ser um solo fértil, acredita-se que houve favorecimento às espécies dos grupos *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*. Isso porque espécies do gênero *Stenotrophomonas* (do grupo *Proteobacteria*) e *Sphingobacterium* (do grupo *Bacteroidetes*), por exemplo, possuem capacidade de se aderir às partículas de solo através de fímbrias, e capacidade de adesão pela composição de seu revestimento celular, respectivamente.

Essas características colaboram a espécies desses grupos em formar agregados, uma vez que fazem com que as partículas tenham maior coesão e assim, maior estabilidade. Espécies que possuem fatores de fixação às partículas do solo e tem células pequenas com poucos micrometros, como *Stenotrophomonas maltophilia*, podem ainda ser protegidas de predadores e condições de estresse, pela formação dos agregados (Caesar-Tonthat *et al.*, 2007).

Assim, a adesão celular às partículas de solo, também tem ligação ao tamanho da célula e a textura do solo. Com a formação de agregados influenciada também pela proporção de areia-silte-argila, que por conseguinte influencia a diversidade microbiana. Segundo Torsvik e Ovreas (2002) a textura do solo pode impactar mais a estrutura da comunidade que fatores como o pH.

Assim *B. megaterium*, que apresentam comprimento entre 2 e 5µm e diâmetro de 1,2 a 1,5µm, sendo células consideradas grandes tanto de forma vegetativa como esporulada, os agregados tendem a ser formados com partículas maiores, como as partículas de areia (Gonzaga *et al.*, 2009), assim a proporção de partículas pode ter influenciado essa distribuição e a não

ocorrência na parcela 5, uma vez que a FT5 mostrou maior proporção de partículas menores de silte e argila (Tabela 2).

4.4.1. Identificação intraespecífica de *Bacillus megaterium*

Como a diversidade de microrganismos leva em conta a composição e variabilidade genética, referente a abundância relativa taxonômica, grupos funcionais ou guildas, e a diversidade interespecífica e intraespecífica, (Andrade *et al.*, 2010), foi realizado o reconhecimento de cepas (ou linhagens) dos isolados identificados como *Bacillus megaterium* a partir da amplificação de região repetitivas do DNA, com o primer GTG₅, ao que se chama *fingerprinting* (Lynch *et al.*, 2004).

Dentre os isolados identificados como *B. megaterium* foram observados nove perfis genéticos distintos, o que sugere a ocorrência de diferentes linhagens desta espécie no solo estudado. O perfil 1 (P1) foi identificado apenas na parcela 1, os perfis 3, 4, 5, 6, 7 e 8 (P3, P4, P5, P6, P7 e P8, respectivamente) identificados apenas na parcela 7, e o perfil (P9) encontrado na parcela 9. Enquanto o perfil 2 (P2) foi identificado nas parcelas 1 e 7 (Figura 7).

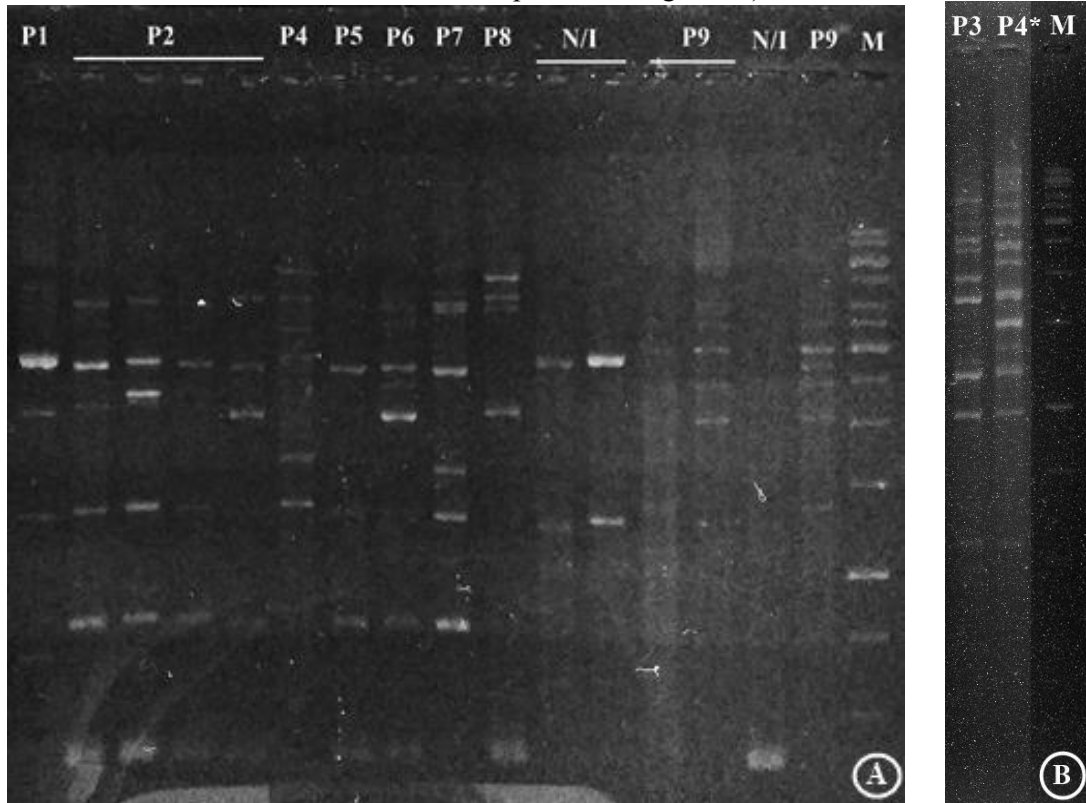
Dentre as parcelas da Fazenda Tamanduá a maior diversidade de *B. megaterium* ocorreu na parcela 7, com sete dos nove perfis, identificados nessa parcela. Infere-se que a diversidade de tipos de *Bacillus megaterium* na FT7 foi influenciada pela alta concentração de fósforo na parcela (Tabela 2), uma vez que o gênero *Bacillus* é representado por bactérias solubilizadoras de fósforo (P) (Val-Moraes *et al.*, 2009), influenciada ainda pela interação com *Burkholderia cepacia*, com uma possível competição à disponibilidade de fósforo.

A ocorrência de perfis distintos entre os isolados sugere a existência de linhagens diferentes de uma mesma espécie, mostrando que a diversidade de bactérias do solo é ainda maior que observada pela identificação específica. E no caso dos isolados com mesma tipagem genética encontrados em parcelas distintas, pode ter ocorrido o carreamento de células bacterianas pelo vento juntamente com partículas do solo, pela água, ou ainda, por animais da região.

B. megaterium tem grande importância a processos de biorremediação, por possuir resistência a metais pesados, bem como, em aplicações biotecnológicas incluindo a prospecção de proteínas recombinantes, vitaminas como a B12, penicilina acilase utilizadas na síntese de β -lactâmicos, α - e β -amilases aplicadas na indústria alimentícia (Arya *et al.*, 2014; Eppinger *et al.*, 2011). Outros estudos relatam ainda, que organismos do grupo *Bacillus* são produtores de melanina e outros pigmentos em ambientes adversos (Tarangini e Mishra, 2014).

Figura 7: Perfis de Rep-PCR obtidos dos isolados da Fazenda Tamanduá

(P1-P9: numeração dos perfis identificados, M- Marcador molecular 1Kb, N/I – Não Identificado, * - mesmo isolado, utilizado como comparativo) (A- Eletroforese dos isolados identificados como *B. megaterium*; B – Eletroforese do isolado não amplificado no gel “A”)



Acervo GDBM

A análise não somente dessa espécie, mas da diversidade específica de bactérias no solo do Semiárido é de suma importância, já que poucos estudos têm investigado a composição da comunidade de solo a granel, com estudos aplicados principalmente a investigações de rizosfera, serapilheira, fitopatogenicidade e manutenção de agrossistemas (Alves *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2007; Silva, 2013; Lima *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2016; Rodrigues, 2016).

Sabendo-se que os trabalhos têm se voltado à conservação dos ecossistemas, sobretudo nos *Hotspots* como é o caso do Semiárido, e que análises de diversidade e equitabilidade de microrganismos têm sido estudados acreditando-se que resultarão na compreensão e manipulação adequada do funcionamento ecossistêmico (Nannipieri *et al.*, 2003), os estudos de diversidade específica e identificação intraespecífica, não somente de *B. megaterium* como de outras espécies, podem colaborar à estudos de biorremediação; preservação e manejo, bioprospecção e outros.

5. CONCLUSÃO

Observou-se uma diversidade de bactérias constituindo a microbiota edáfica da RPPN Fazenda Tamanduá, cujo filo mais representativo foi *Firmicutes*, representado principalmente pelo gênero *Bacillus*.

Cada parcela apresentou sua especificidade quanto a microbiota, sendo a parcela 5 a de maior diversidade total. Cada parcela apresentou ainda espécies predominante com *L. shishuensis*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Micrococcus luteus*, predominantes nas FT1, FT5 e FT9, respectivamente, enquanto a FT7 foi representada principalmente por *B. megaterium* e *Burkholderia cepacia*.

Bacillus megaterium foi ainda, a espécie de maior representatividade entre as parcelas, e sua tipagem intraespecífica possibilitou a identificação de nove perfis genéticos distintos. Esses perfis indicam uma diversidade de linhagens bacterianas distintas, e conseqüentemente uma diversidade de bactérias maior que a indicada pela identificação específica.

A análise da distribuição dessas bactérias e a abundância de grupos como *Bacillus*, indica que a microbiota tem se especializado as condições do Semiárido, como temperatura e precipitação. Apesar do presente trabalho não ter feito identificação morfológica, os dados de morfologia confirmam essa especialização, de forma que a morfologia mais comum foi a produção de pigmentos amarelos, indicando respostas metabólicas a incidência de radiação.

Assim, o presente estudo como um dos primeiros trabalhos com enfoque na diversidade edáfica no Semiárido paraibano em solo a granel, pode contribuir não somente ao conhecimento taxonômico da região, mas a preservação e manejo desses ecossistemas. Pode ainda contribuir a estudos de bioprospecção, uma vez que foram identificações bactérias como *Micrococcus luteus* e *B. megaterium* já exploradas em produções de pigmentos e outras moléculas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABURJAILE, S. B. *et al.* Pesquisa e caracterização da diversidade microbológica do solo, na região de São José do Buriti–MG, em decorrência da substituição de cobertura florestal nativa (Cerrado) por plantações de eucalipto. *Ciência Equatorial*, v. 1, n. 2, 2011.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ALVAREZ, C. R. *et al.* Associations between organic matter fractions and the active soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 30, n. 6, p. 767-773, 1998.
- ALVES, A. R. *et al.* Aporte e decomposição de serrapilheira em área de Caatinga, na Paraíba. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 6, n. 2, p. 194-203, 2006.
- ALVES, J. J. A.; DE ARAÚJO, M. A.; DO NASCIMENTO, S. S. Degradação da Caatinga: uma investigação ecogeográfica. *Revista Caatinga*, v. 22, n. 3, p. 126-135, 2009.
- ANDRADE, D. C. *et al.* Desafios teóricos e metodológicos para avaliação de políticas para a preservação da biodiversidade e serviços ecossistêmicos. In: Encontro Nacional da ANPPAS, 5, 2010, Florianópolis. Artigo em anais de congresso (CNPTIA), ANPPAS 10 anos: avaliando os desafios teóricos e as novas agendas públicas. [S.l.]: ANPPAS, 2010. p. 1-17. ENANPPAS 2010.
- ANSELMO, A. F. *et al.* Abundância, riqueza de espécies e sazonalidade de borboletas (*Lepidoptera: Hesperioidea e Papilionoidea*) visitantes florais em área de Caatinga e floresta ciliar no semiárido Paraibano. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, v. 10, n. 1, 2014.
- ARYA, G. *et al.* Draft genome sequence of *Bacillus megaterium* type strain ATCC 14581. *Genome announcements*, v. 2, n. 6, p. e01124-14, 2014.
- AZEVEDO, C. M. A. Bioprospecção: coleta de material biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos. Reserva da biodiversidade da Mata Atlântica-MAB-UNESCO. 2ªed, cad, v. 17, p. 35, 2003.
- BALOTA, E. L. *et al.* Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. *Bras. Ci. Solo*, v. 22, p. 641-649, 1998.
- BELTRÃO, B. A. *et al.* Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea estado da Paraíba. Diagnóstico do município de Santa Terezinha. CPRMServiço Geológico do Brasil e Programa de Desenvolvimento Energético dos Estados e Municípios - PRODEEM. Recife, 2005.
- BELTRÃO, M. G. Biomassa aérea no semiárido da Paraíba, Brasil. 2014. 85p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, 2014.
- BERTHIER, F. *et al.* Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. *International Dairy Journal*, v. 11, n. 4, p. 293-305, 2001.

BRAEM, G. *et al.* (GTG) 5-PCR fingerprinting for the classification and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine milk and teat apices: A comparison of type strains and field isolates. *Veterinary microbiology*, v. 147, n. 1, p. 67-74, 2011.

BUCKLEY, D. H.; SCHMIDT, T. M. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial ecology*, v. 42, n. 1, p. 11-21, 2001.

BUCKLEY, D. H.; SCHMIDT, T. M. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology*, v. 5, n. 6, p. 441-452, 2003.

CAESAR-TONTHAT, T. C. *et al.* Taxonomic diversity of predominant culturable bacteria associated with microaggregates from two different agroecosystems and their ability to aggregate soil in vitro. *applied soil ecology*, v. 36, n. 1, p. 10-21, 2007.

CAMARGO, O. A. *et al.* Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agrônômico de Campinas. Campinas, Instituto Agrônômico, 2009. 77 p. (Boletim técnico, 106, Edição revista e atualizada). 2009.

CARDOSO, A. M. Bioprospecção de novos genes para a indústria usando metagenoma e bioinformática. *Acta Scientiae et Technicae*, v. 1, n. 1, 2013.

CARNEIRO, M. A. C. *et al.* Atributos físicos, químicos e biológicos de solo de Cerrado sob diferentes sistemas de uso e manejo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 33, n. 1, p. 147-157, 2009.

CARVALHO, R. M. M. *et al.* Bactérias solubilizadoras de fosfato em solo rizosférico da Caatinga. *Revista Geonorte*, v. 7, n. 26, p. 48-60, 2016.

CASE, R. J. *et al.* Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and environmental microbiology*, v. 73, n. 1, p. 278-288, 2007.

CHAPAVAL, L. *et al.* Aplicação da técnica de REP-PCR no rastreamento de *Staphylococcus aureus* em sala de ordenha, para o monitoramento da qualidade do leite. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 43, n. 3, p. 309-320, 2006.

CHARLOP-POWERS, Z. *et al.* Chemical-biogeographic survey of secondary metabolism in soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 10, p. 3757-3762, 2014.

CHARLOP-POWERS, Z. *et al.* Global biogeographic sampling of bacterial secondary metabolism. *Elife*, v. 4, p. e05048, 2015.

DE ANDRADE, R. L. *et al.* Deposição de serrapilheira em área de Caatinga na RPPN “Fazenda Tamanduá”, Santa Terezinha-PB. *Revista Caatinga*, v. 21, n. 2, 2008.

DE ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. *Bioscience Journal*, v. 23, n. 3, 2007.

DELMONT, T. O. *et al.* Reconstructing rare soil microbial genomes using in situ enrichments and metagenomics. *Frontiers in microbiology*, v. 6, 2015.

- DEL VECCHIO, V. G. *et al.* Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. *Journal of clinical microbiology*, v. 33, n. 8, p. 2141-2144, 1995.
- DOS ANJOS BORGES, L. G.; DALLA VECHIA, V.; CORÇÃO, G. Characterisation and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 45, n. 2, p. 173-180, 2003.
- EPPINGER, M. *et al.* Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* strains QM B1551 and DSM319. *Journal of bacteriology*, v. 193, n. 16, p. 4199-4213, 2011.
- EUZÉBY, J.P. List of Bacterial names with Standing in Nomenclature. 1997-present.
- FREITAS, A. D. S. *et al.* Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. *Bragantia*, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007.
- GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, v. 205, n. 1, p. 3136, 2001.
- GEVERS, D. *et al.* Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 9, p. 733-739, 2005.
- GIRI, B. *et al.* Microbial diversity in soils. In: *Microorganisms in soils: Roles in Genesis and functions*. Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 19-55.
- GONÇALVES, V. A. Caracterização da comunidade bacteriana do solo da Mata Atlântica produtora de substâncias de interesse biotecnológico. 2006. 65p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de Mogi Das Cruzes, São Paulo, 2006.
- GONZAGA, M. C. *et al.* Cinética de crescimento de *Bacillus megaterium* recombinante para a produção de penicilina G acilase (PGA). In: VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. 2009.
- GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H. D. M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, n. 1, p. 135-141, 2007.
- GRUPO DE TRABALHO INTERMINISTERIAL. Nova delimitação do semi-árido Brasileiro. Brasília: Ministério da Integração Nacional, 2005.
- HAO, D.C.; Ge, G.B.; Yang, L. Bacterial diversity of *Taxus* rhizosphere: culture-independent and culture-dependent approaches. *FEMS microbiology letters*, v. 284, n. 2, p. 204-212, 2008.
- HEALY, M. *et al.* Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *Journal of clinical microbiology*, v. 43, n. 1, p. 199-207, 2005.
- HORNER-DEVINE, M. C.; CARNEY, K. M.; BOHANNAN, B. J. M. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 271, n. 1535, p. 113-122, 2004.

HORNINK, K. R. Isolamento e identificação de bactérias com potencial para realizar biorremediação de cobre. 2015. 44 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2015.

ISHII, S.; SADOWSKY, M. J. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environmental microbiology*, v. 11, n. 4, p. 733-740, 2009.

JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006.

KAMPE, B.; RÖSCH, P.; POPP, J. Characterization of carotenoids in soil bacteria and investigation of their photodegradation by UVA radiation via resonance Raman spectroscopy. *Analyst*, v. 140, n. 13, p. 4584-4593, 2015.

KANG, H. P.; DUNNE, W. M. Stability of repetitive-sequence PCR patterns with respect to culture age and subculture frequency. *Journal of clinical microbiology*, v. 41, n. 6, p. 2694-2696, 2003.

KATHLEEN, M. M. *et al.* (GTG)₅-PCR analysis and 16S rRNA sequencing of bacteria from Sarawak aquaculture environment. *International Food Research Journal*, v. 21, n. 3, p. 915-920, 2014.

KAVAMURA, V. N. *et al.* Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. *PloS one*, v. 8, n. 9, p. e73606, 2013.

KAVAMURA, V. N. *et al.* Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological research*, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013 (b)

KÜGLER, J. H. *et al.* Surfactants tailored by the class *Actinobacteria*. *Frontiers in microbiology*, v. 6, 2015.

KUMAR, A. *et al.* Sustainable way for enhancing phosphorus efficiency in agricultural soils through phosphate solubilizing microbes. *J. Soil Sci*, v. 9, n. 2, p. 300-310, 2014.

LANÇONI, M. D. *et al.* Microbial community biogeographic patterns in the rhizosphere of two Brazilian semi-arid leguminous trees. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 7, p. 1233-1241, 2013.

LANGE, M. *et al.* Biotic and abiotic properties mediating plant diversity effects on soil microbial communities in an experimental grassland. *PLoS One*, v. 9, n. 5, p. e96182, 2014.

LEAL, K. R. D. *et al.* Conservação na caatinga: em que pé estamos. *In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, 8, 2007, Caxambu – MG. Anais do congresso (CEB). 2007.

LIMA, J. V.L.; DE SOUSA PINHEIRO, M.; GUEDES, L. M. C. Populações microbianas cultiváveis do solo e serrapilheira de uma unidade de conservação no semiárido brasileiro. *Enciclopédia Biosfera*, v. 10, p. 2300-2316, 2014.

LIRA, G. T. R. Diversidade em comunidades bacterianas de solos de matas de galeria do Cerrado. 2012. xiv, 125f., il. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

LISBOA, E. B. F. *et al.* Densidade de *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel, 1867) em sítios de reprodução na caatinga, nordeste do Brasil. *Nature and Conservation*, v. 6, n. 1, p. 54-60, 2013.

LOUWS, F. J. *et al.* rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, v. 88, n. 8, p. 862-868, 1998.

LUCENA, B. T. L. Diversidade genética de bactérias lácticas presentes em destilarias de álcool combustível nos Estados da Paraíba e Pernambuco. 2010. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

LYNCH, J. M. *et al.* Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*, v. 40, n. 6, p. 363-385, 2004.

MADIGAN, M. T. *et al.* *Microbiologia De Brock*. 12^a edição, editora Artmed. Porto Alegre, 2010.

MARTINS, C. M. *et al.* Atributos químicos e microbianos do solo de áreas em processo de desertificação no semiárido de Pernambuco. *R. Bras. Ci. Solo*. Vol.34, p.1883-1890, 2010.

MASCO, L. *et al.* Identification of *Bifidobacterium* species using rep-PCR fingerprinting. *Systematic and applied microbiology*, v. 26, n. 4, p. 557-563, 2003.

MASSENSINI, A. M. *et al.* Isolamento e caracterização de bactérias solubilizadoras de fosfato da rizosfera de *Eucalyptus sp.* *Revista Árvore*, v. 40, n. 1, p. 125-134, 2016.

MONTEALEGRE, C. M. C. Diversidade microbiana e biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em solos da Ilha da Trindade submetidos à bioestimulação. 2014. 41p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2014.

MOREIRA, J. L. S. *et al.* Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC microbiology*, v. 5, n. 1, p. 1, 2005.

MORITZ, D.E. Produção do pigmento Monascus por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

NANNIPIERI, P. *et al.* Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, v. 54, n. 4, p. 655-670, 2003.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, V. C. *et al.* População microbiana de solos sob diferentes agroecossistemas e vegetação nativa no Semi-Árido. *Revista Brasileira De Agroecologia*, v. 2, n. 1, 2007.

OLIVINDO, C. S. Detecção de microrganismos utilizando a técnica de PCR em sequencias palindromicas extragenicas repetidas (rep-PCR) no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. 2007. 64f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

PACCHIONI, R. G. *et al.* Taxonomic and functional profiles of soil samples from Atlantic forest and Caatinga biomes in northeastern Brazil. *Microbiology Open*, v. 3, n. 3, p. 299-315, 2014.

PEREIRA, I. M. *et al.* Regeneração natural em um remanescente de caatinga sob diferentes níveis de perturbação, no agreste paraibano. *Acta Botanica Brasilica*, v. 15, n. 3, p. 413-426, 2001.

PEREIRA, K. C. Caracterização morfológica, bioquímica e molecular de rizóbios recomendados para inoculação de leguminosas arbóreas. 2002. 63 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2002.

RAMPELOTTO, P. H. *et al.* Changes in diversity, abundance, and structure of soil bacterial communities in Brazilian Savanna under different land use systems. *Microbial ecology*, v. 66, n. 3, p. 593-607, 2013.

REN, G. *et al.* Evident bacterial community changes but only slight degradation when polluted with pyrene in a red soil. *Frontiers in microbiology*, v. 6, 2015.

RODRIGUES, T. B. Diversidade Metagenômica Microbiana De De Biomas Terrestres E Marinhas. 2011. 250f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Genética)). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

RODRIGUES, D. R. Diversidade e eficiência em promoção do crescimento vegetal de bactérias de solos da caatinga pernambucana oriundas de nódulos de leguminosas arbóreas nativa. 2016. 79f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - PPGCA). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

ROESCH, L. F. W. *et al.* Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. *Revista brasileira de ciência do solo*. Campinas. Vol. 31, n. 6 (nov./dez. 2007), p. 1367-1380, 2007.

ROS, M. *et al.* Molecular and physiological bacterial diversity of a semi-arid soil contaminated with different levels of formulated atrazine. *Applied Soil Ecology*, v. 34, n. 2, p. 93-102, 2006.

RYBERG, A. *et al.* Comparison of (GTG) 5-oligonucleotide and ribosomal intergenic transcribed spacer (ITS)-PCR for molecular typing of *Klebsiella* isolates. *Journal of microbiological methods*, v. 84, n. 2, p. 183-188, 2011.

SADOWSKY, M. J. *et al.* Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strains. *Applied and environmental microbiology*, v. 62, n. 9, p. 3489-3493, 1996.

SADOWSKY, M. J.; HUR, H. G. Use of endogenous repeated sequences to fingerprint bacterial genomic DNA. In: *Bacterial genomes*. Springer US, 1998, p. 399-413, 1998.

- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.
- SCHIMEL, J.; BALSER, T. C.; WALLENSTEIN, M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, v. 88, n. 6, p. 1386-1394, 2007.
- SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. *World journal of microbiology and biotechnology*, v. 12, n. 2, p. 163-174, 1996.
- SILVA, R. R. *et al.* Biomassa e atividade microbiana em solo sob diferentes sistemas de manejo na região fisiográfica Campos das Vertentes-MG. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 34, n. 5, p. 1585-1592, 2010.
- SILVA, M. S. Identificação de actinobactérias em solos de cerrado mineiro durante estação de baixa pluviosidade. 2012. 100 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- SILVA, G. R. Bioprospecção de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis Tul.* do bioma Caatinga. 2013. 93p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2013.
- SILVEIRA, E. L. Identificação de comunidades bacterianas de solo Por seqüenciamento do gene 16S rRNA. 2004. 62f. 2004. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- SOARES JR, F. L. *et al.* Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 5, p. 2195-2203, 2012.
- SCHLOSS, P. D.; GEVERS, D.; WESTCOTT, S. L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PloS one*, v. 6, n. 12, p. e27310, 2011.
- SOUTO, P. C. *et al.* Decomposição de esterco dispostos em diferentes profundidades em área degradada no semi-árido da Paraíba. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 29, n. 1, p. 125-130, 2005.
- SOUTO, P. C. *et al.* Comunidade microbiana e mesofauna edáficas em solo sob Caatinga no semi-árido da Paraíba. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, n. 1, p. 151-160, 2008.
- SPIGAGLIA, P.; MASTRANTONIO, P. Evaluation of repetitive element sequencebased PCR as a molecular typing method for *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology*, v. 41, n. 6, p. 2454-2457, 2003.
- STAMFORD, N. P. *et al.* Microbiota dos solos tropicais. *In: Michereff SJ, Andrade DEGT, Menezes M Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais*. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, p. 61-92, 2005.
- SUN, D. *et al.* Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity. *Applied and environmental microbiology*, v. 79, n. 19, p. 5962-5969, 2013.

SUREKHA, P. Y. *et al.* *Micrococcus luteus* Strain BAA2, A novel isolate produces carotenoid pigment. *Electronic Journal of Biology*, 2016.

TAMURA, K. *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TARANGINI, K.; MISHRA, S. Production of melanin by soil microbial isolate on fruit waste extract: two step optimization of key parameters. *Biotechnology Reports*, v. 4, p. 139-146, 2014.)

TELINO-JÚNIOR, W. R.; DE LYRA-NEVES, R. M.; DE NASCIMENTO, J. L. X. *Biologia e composição da avifauna em uma Reserva Particular de Patrimônio Natural da caatinga paraibana. Ornithologia*, v. 1, n. 1, p. 49-58, 2010.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

THOMPSON, F. L. *et al.* Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 24, n. 4, p. 520-538, 2001.

TOBES, R.; RAMOS, J. L. REP code: defining bacterial identity in extragenic space. *Environmental microbiology*, v. 7, n. 2, p. 225-228, 2005.

TORRES, C.P.; PRAGER, M.S. Isolation and identification of phosphate-solubilizing bacteria inhabiting the rizhosphere of peach palm (*B. gassipaes Kunth*). *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, v. 10, n. 2, p. 177-187, 2012.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in microbiology*, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.

USSERY, D. W. *et al.* Genome update: DNA repeats in bacterial genomes.

Microbiology, v. 150, n. 11, p. 3519-3521, 2004.

VAL-MORAES, Silvana Pompéia *et al.* Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. *Revista Ciência Agronômica*, v. 40, n. 1, p. 7-16, 2009.

VAN BRUGGEN, A. H. C. *et al.* Relation between soil health, wave-like fluctuations in microbial populations, and soil-borne plant disease management. *In: Plant disease epidemiology: facing challenges of the 21st Century*. Springer Netherlands, 2006. p. 105-122, 2006.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research*, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J. *et al.* Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequencebased polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology*, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1994.

VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Interspersed repetitive sequences in bacterial genomes. *In: Bacterial Genomes*. Springer US, 1998. p. 38-48, 1998.

WARDLE, D. A. The influence of biotic interactions on soil biodiversity. *Ecology letters*, v. 9, n. 7, p. 870-886, 2006.

ZILLI, J. E. *et al.* Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.