



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

RAÍSSA DE FÁTIMA FERREIRA DA COSTA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS EDÁFICAS EM DUAS ÁREAS DE
PROTEÇÃO AMBIENTAL DO SEMIÁRIDO PARAIBANO**

**JOÃO PESSOA
2018**

RAÍSSA DE FÁTIMA FERREIRA DA COSTA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS EDÁFICAS EM DUAS ÁREAS DE
PROTEÇÃO AMBIENTAL DO 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^a. Dr^a. Brígida Thais Luckwu de Lucena.

**JOÃO PESSOA
2018**

É expressamente proibido 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 do trabalho.

C837d Costa, Raissa de Fatima Ferreira da.
Diversidade genética de bactérias edáficas em duas áreas de proteção ambiental do semiárido paraibano [manuscrito] / Raissa de Fatima Ferreira da Costa. - 2018.
49 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2019.
"Orientação : Profa. Dra. Brígida Thais Luckwu de Lucena, Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."
1. Diversidade bacteriana. 2. Identificação molecular. 3. Semiárido. I. Título
21. ed. CDD 579.3

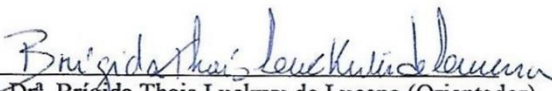
RAÍSSA DE FÁTIMA FERREIRA DA COSTA

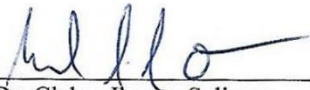
DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS EDÁFICAS EM DUAS ÁREAS DE
PROTEÇÃO AMBIENTAL DO SEMIÁRIDO PARAIBANO

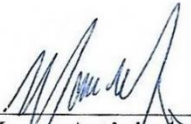
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de graduação em Ciências Biológicas
da Universidade Estadual da Paraíba, como
requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 19/06/2018.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Brígida Thais Luckwu de Lucena (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Cleber Ibraim Salimon
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

A minha família, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me concedido saúde, força e disposição para superar às dificuldades e persistir em meu sonho.

À minha família, porque foram eles que me incentivaram e inspiraram através de gestos e palavras a superar todas as dificuldades.

Agradeço a minha orientadora, Brígida Lucena, que muito admiro, agradeço pela paciência e pela oportunidade, pelos ensinamentos que foram fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao professor Cleber Ibraim Salimon, pela coleta e dados físicos e químicas do solo, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Tive a oportunidade de ter professores repletos de sabedoria e paciência e por isso a todos agradeço do fundo do meu coração.

Agradeço a minha parceira de trabalho e amiga Anna Gabrielly, pelo companheirismo, pela paciência e por todos os ensinamentos. Obrigada à Jicaury, Maria Helena, Adriana, Otoniel, Sarah, Anderson, Glacy, Neto, Layanne, por terem acreditado na minha capacidade e não me deixarem desistir.

Ao CNPq pelo financiamento desse projeto.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

“Acredite no poder da palavra “desistir” tire o D coloque o R, que você vai resistir. Uma pequena mudança as vezes traz esperança e faz a gente seguir.”

Bráulio Bessa.

RESUMO

A microbiota da Caatinga é submetida a condições peculiares, como mudanças de temperatura, intensa radiação solar e estresse hídrico, desta forma, espera-se uma especialização desses microrganismos. Sabe-se pouco sobre os microrganismos presente no solo dessa região, sendo assim, o conhecido dessa diversidade pode auxiliar na compreensão das estratégias adaptativas adotadas por esses organismos para sobreviverem no solo da Caatinga, e a longo prazo, podem auxiliar ações futuras direcionadas à preservação e ao uso sustentável do semiárido brasileiro, assim como a prospecção de produtos bioativos que volta a ser alvo, nos últimos anos, da indústria farmacêutica e indústria alimentícia. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade da comunidade microbiana em duas áreas da Caatinga no semiárido Paraibano através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e da REP-PCR com o primer (GTG)₅. Os nossos resultados revelaram que o filo Firmicutes foi o mais abundante nos solos das duas áreas, sendo o gênero *Bacillus* o mais representativo. *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* e *Enterobacter cloacae* foram identificadas nas duas áreas, já as espécies *Bacillus thuringiensis*, *Paenibacillus sp.*, *Serratia marcescens*, *Routella sp.*, e *Celullomonas sp.* foram encontradas apenas na APA Cariri. Enquanto, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Micrococcus luteus*, e *Leifsonia shinshuensis* ocorreram apenas na Fazenda Tamanduá. Além da identificação, os isolados bacterianos, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae* e *Celullomonas sp.*, espécies mais representativas na APA Cariri e *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus megaterium* na Fazenda Tamanduá, foram tipificados por REP-PCR com o primer (GTG)₅, demonstrando diversidade de perfis genéticos, desta forma, os resultados demonstram que nas áreas estudadas além da diversidade de espécies bacterianas pode existir uma diversidade de linhagens dessas espécies, o que pode refletir diferentes estratégias adaptativas ao ambiente. Este é um trabalho pioneiro que aborda a diversidade edáfica de duas áreas no Semiárido paraibano, portanto, trabalhos futuros visam correlacionar os isolados com diferentes perfis intra-específicos com mecanismos adaptativos desenvolvidos por estes, o que pode contribuir para estudos de preservação e manejo desse ecossistema.

Palavras-Chave: Diversidade Bacteriana, Identificação molecular, Semiárido.

ABSTRACT

Microorganisms found in this ecosystem exhibit specific mechanisms to ensure their survival in this environment that provides singular conditions, such as temperature changes, intense solar radiation and hydrous stress. Because of that, it is expected a high specialization of this microbiota. Despite this, there are few data in the scientific literature about bacterial community in caatinga soil, although, the knowledge of this microbiota could help in conservation and maintenance programs of this ecosystem, and, in addition, may provide new alternatives to bioprospection of enzymes and bioactive substances, providing an important alternative for economic and social development of the region. Therefore, this work aimed to identify the diversity of microbial community in two areas of the Caatinga in semiarid Paraíba through the partial sequencing of the 16S rRNA gene and REP-PCR. Our results showed that Firmicutes phylum was the most abundant in soils of both areas, and the genus *Bacillus* was the most representative. *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* and *Enterobacter cloacae* were identified in the two areas, the species *Bacillus thuringiensis*, *Paenibacillus sp.*, *Serratia marcescens*, *Routella sp.*, and *Celullomonas sp.* were exclusive at APA Cariri. While *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Micrococcus luteus*, and *Leifsonia shinshuensis*, were exclusive to Fazenda Tamanduá. In addition to identifying, the most representative species of two areas were typed by REP-PCR with "primer" (GTG) 5, showing the diversity of genetic profiles, in this way, the results showed that in the studied areas besides the diversity of bacterial species there can be a diversity of lineages of these species, which may reflect different strategies adaptive to the environment. This is a pioneering work that addresses the edaphic diversity of two areas in the semi-arid region of Brazil, so future works aim to correlate the isolates with different intraspecific profiles with adaptive mechanisms developed by them, which may contribute to the preservation and management studies of this ecosystem.

Keywords: Bacterial diversity. Molecular identification. Semiarid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mapa das áreas de coleta amostrais	8
Figura 2 – Espécies identificadas nas APA Cariri e Fazenda Tamanduá	14
Figura 3 – Distribuição dos gêneros dominantes da APA Cariri	14
Figura 4 – Distribuição dos gêneros dominantes da Fazenda Tamanduá	16
Figura 5 – Perfis de Rep-PCR obtidos das espécies exclusivas da APA Cariri	19
Figura 6 – Perfis de Rep-PCR obtidos das espécies exclusivas Fazenda Tamanduá	20
Figura 7 – Perfis de Rep-PCR obtidos das espécies exclusivas Fazenda Tamanduá	20
Figura 8 – Perfis de Rep-PCR obtidos das espécies encontradas nas duas áreas	21
Figura 9 – Perfis de Rep-PCR obtidos dos isolados da Fazenda Tamanduá e APA CARIRI	22
Figura 10 – Perfis de Rep-PCR obtidos dos isolados da APA CARIRI	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APA - Área de Proteção Ambiental

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BLAST N – *BLAST* Padrão de nucleotídeo

dNTP - Desoxinucleotídeos trifosfatos

ERIC - *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*

FT1 – Parcela 1

FT5 – Parcela 5

FT7 – Parcela 7

FT9 – Parcela 9

GDBM – Grupo de Diversidade e Biotecnologia Microbiana

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

P10 – Perfil 10

P11 – Perfil 11

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RDP - *Ribosomal Database Project*

REP - Elementos palindrômicos repetitivos

rep-PCR - PCR de elementos palindrômicos repetitivos

RPPN - Reserva Particular do Patrimônio Natural

rRNA - RNA ribossômico

SJC2 – Parcela 2

SJC5 – Parcela 5

SJC6 – Parcela 6

SJC7 – Parcela 7

TBE - Tris/Borato/EDTA

TE – Tampão Tris-EDTA

TSB – Caldo Triptona de Soja

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

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

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

μL – Microlitro

μm – Micrómetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	7
2.1	Objetivo Geral	7
2.2	Objetivos específicos	7
3	METODOLOGIA	8
3.1	Área de coleta	8
3.2	Isolamento das bactérias	8
3.3	Identificação molecular	9
3.3.1	Extração de DNA	9
3.3.2	REP-PCR	10
3.3.3	Sequenciamento	10
4	RESULTADO E DISCUSSÃO	11
4.1	Análise da Abundância	11
4.2	Análise da diversidade	13
4.2.1	Diversidade de espécies específicas da APA Cariri	14
4.2.2	Diversidade de espécies específicas da Fazenda Tamanduá	16
4.3	Análise intraespecífica	17
4.3.1	Espécies exclusivas da APA Cariri	18
4.3.2	Espécies exclusivas Fazenda Tamanduá	19
4.3.3	Espécies encontradas nas duas áreas	20
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
6	REFERENCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos são submetidos a condições abióticas e nutricionais variadas, desta forma cada micro-habitat é ocupado por aqueles que são aptos a colonizar o ambiente e se estabelecer. A maior parte da biomassa viva no solo é composta por microrganismos, que participam dos ciclos biogeoquímicos, disponibilizando energia e nutrientes no solo, esses organismos exercem atividade de decomposição de matéria orgânica, fazem o controle biológico de pragas e doenças em plantas, promovem o crescimento vegetal, sendo assim, desempenham um importante papel na manutenção do solo e produtividade (Hill *et al.*, 2000; Barea *et al.*, 2005; Silva, 2012).

Durante vários anos, a Caatinga foi considerada um ecossistema com baixa biodiversidade, mas estudos recentes têm confirmado que ele suporta um alto endemismo de plantas e animais (Leal *et al.*, 2005). As condições ambientais descontínuas do solo, como sua composição, capacidade de intercâmbio de íons, pH, disponibilidades de água, variações climáticas, estrutura do solo e atividade biológica (simbiose, comensalismo, predação, mutualismo e competição), atuam diretamente na diversidade e composição das comunidades microbianas (Grisi, 2011; Monteiro, 2012; Nascimento, 2013; Bononi, 2016).

A Caatinga corresponde a cerca de 11% do território nacional, ocupando 70% do nordeste brasileiro, sendo presente em quase todos os estados do Nordeste, com exceção do Maranhão. A formação vegetal da Caatinga com relação à sua aparência e composição é considerada heterogênia, abrigando uma alta diversidade de espécies arbustivas e arbóreas de pequeno porte, frequentemente dotadas de espinhos (Telino-Júnior, 2010; De Mello, 2012; Pereira Júnior, 2012; Alves, 2013; Melo, 2016).

A vegetação da Caatinga em geral é caracterizada como arbóreo-arbustivas, crescem em solos que passam por longos períodos de seca, diante disso, desenvolveu adaptações morfológicas e/ ou fisiológicas que minimizam os efeitos dos longos períodos de seca, dentre esses mecanismos, podemos destacar a caducifolia, fechamento estomático, senescência e ajustamento osmótico, dado o início do período de estiagem, a Caatinga exibe uma feição seca, sem folhagem, daí a origem do nome "caatinga", que vem do Tupi e significa "mata branca", referindo-se à estratégia ecofisiológica à deficiência hídrica (Da Silva, 2004; Leal, 2005; Sousa, 2006; Costa, 2009; Melo, 2016).

O clima característico da Caatinga é o semiárido, com uma grande incidência de radiação solar, temperaturas que oscilam entre 22° C e 32° C, e solos expostos à luminosidade cerca de 2.800 horas no ano (Melo, 2016), apresentam ainda uma baixa taxa de umidade relativa

e baixa nebulosidade, composto por um regime pluviométrico baixo, onde a maior parte da região recebe menos de 750 mm e em áreas mais centrais menos de 500mm (Leal, 2005), com duas estações bem distintas: uma estação chuvosa, com duração de três à cinco meses, e uma longa estação de seca, de sete a nove meses, ocorrendo nos meses de junho à dezembro, ocasionando uma elevada evaporação, com um marcante déficit hídrico (De Mello, 2012).

As regiões áridas e semiáridas sofrem naturalmente degradação, devido as condições climáticas características do semiárido. Entretanto, práticas agropecuárias como, a retirada de espécies vegetais nativas por cultivos pastagens e as queimadas, resultam em um desequilíbrio da fauna, causam degradação da cobertura vegetal e aceleram processos erosivos no solo, portanto, ocorre à perda de diversidade biológica (Oliveira *et al.*, 2008; Telino-Júnior, 2010; Grisi, 2011; De Mello, 2012; Beltrão, 2014).

O semiárido paraibano apresenta distintas classes de solos, com diferentes características morfológicas e posições na paisagem, as planícies são caracterizadas por solos do tipo latossolos, são argilosos e minerais, com boa porosidade e rico em nutrientes. Os planaltos, são gerados da decomposição do arenito, solos pobres em nutrientes e ácidos, resultando em depósitos arenosos ou pedregosos rasos (Lima, 2017).

O solo é formado a partir da decomposição de um material rochoso, sendo composto por partículas sólidas (minerais e orgânicas – matriz do solo), uma fração gasosa (poros – ar do solo) e uma fração líquida (constituída por água e sais – solução do solo), a proporção das partículas de areia, silte e argila, constituem a textura do solo, a organização desses componentes formam agregados, esse sistema de poros possibilita a formação de microhabitats, que variam quanto à forma, composição e estabilidade, produzindo um mosaico de microambientes com características complexas e heterogêneo, um habitat único que possibilita o desenvolvimento das mais diversas formas de vida (Torsvik; Øvreås, 2002; Ranjard, 2001).

As bactérias são consideradas mais abundantes em relação aos outros microrganismos no solo (Bononi, 2016). Os filos mais encontrados nos solos são, Actinobacteria, Proteobacteria, Planctomycetes, Acidobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Cyanobacteria e Bacteroidetes (Moreira, 2006; Ferreira, 2016). Apesar dos poucos estudos em solo da Caatinga, alguns trabalhos demonstram que os filos Proteobacteria, Firmicute, Actinobacteria e Acidobacteria são os mais abundantes em solos com características peculiares como, pouca umidade e temperaturas elevadas assim como encontramos na Caatinga (Moreira, 2006). Segundo Chanal *et al.* (2006) estudando um deserto ao sul da Tunísia encontrou predominância dos filos Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria. De acordo com Ferreira (2016), encontrou a abundancia dos filos Bacteroidetes, Firmicutes e Chloroflexi em solos

desertificados da Caatinga. Em solos desertos da antártica Van Horn (2013) encontrou a dominância dos filos Actinobacteria, Acidobacteria e Bacteroidetes. Neilson et al., (2012), em solos áridos do Deserto do Atacama no Chile encontrou dominância de Actinobacteria e Chloroflexi.

As bactérias podem apresentar mecanismos adaptativos como o desenvolvimento de estruturas resistentes, sendo elas, uma morfologia filamentosa, ou estruturas de resistência como esporos e endósporos, que são estruturas mais resistentes que as células vegetativas, pois resistem ao calor, a radiação ultravioleta e dessecação, além disso podem produzir compostos bioativos (Frechaut, 2014), como enzimas e antibióticos que inibem o crescimento de outras bactérias e possíveis predadores, alguns membros podem ainda ser metabolicamente diversos (Rampelotto, 2013); assim como relatado por Gorch-Lira e Coutinho (2007) em solos do cariri paraibano que isolaram cepas com atividades celulolítica, amilolítica, proteolítica e quitinolítica.

A biota do solo pode ser classificada em micro, meso e macrofauna, tendo como base seu tamanho (Moreira, 2006). As primeiras camadas do solo, entre 1 a 30 cm de profundidade, abrigam uma grande quantidade de microrganismos, que ocupam menos de 0,5 % do volume total do solo (Da Silva, 2013; Bononi, 2016). Portanto, um grama de solo pode abrigar uma vasta diversidade de microrganismos desconhecidos.

Os estudos voltados para ecologia microbiana ainda são limitados, principalmente em solos da Caatinga, estimasse que no máximo 10% das espécies microbianas foram descobertas, dependendo do hábitat estudado, mostrando assim a vasta diversidade microbiana que ainda se encontra desconhecida (Araújo, 2011; Mesquita, 2011).

A palavra Ecologia tem origem no grego *oikos* e significa casa e *logos* que significa estudo, portanto, estudo da casa, a partir disto surgiu à Ecologia Microbiana, que é responsável por analisar à interação dos microrganismos com o ambiente biótico e abiótico (Araújo, 2011).

Apesar da vasta diversidade microbiana existe, a caracterização taxonômica convencional (morfológica e bioquímica) para identificação da microbiota, tem aplicação limitada a grupos de microrganismos que podem ser isolados e cultivados em condições de laboratoriais, devido a variabilidade fenotípica apresentada pelos microrganismos, essa técnica apresenta baixo poder discriminatório, portanto, a aplicação de técnicas moleculares podem ser mais precisas em classificar as linhagens individuais de bactérias em espécies, e o arranjo de espécies em gêneros e grupos superiores (Gevers, 2005; Madigan, 2010; Klaczko, 2003; Rosselló-Mora, 2001).

Diferentes técnicas têm sido aplicadas a bactérias como ferramentas para a identificação e diferenciação inter e intra-específica, como a técnica de Polymerase chain reaction – Reação em cadeia da polimerase (PCR) que possibilita estudos a nível molecular das células microbianas, sendo possível realizar estudos com espécies microbianas cultiváveis e não-cultiváveis (Chapaval, 2006; Deuner, 2012). A maior vantagem dessa técnica de tipagem está baseada no polimorfismo de DNA e no seu alto poder discriminatório, cuja aplicabilidade é universal. Essas metodologias vêm permitindo a diferenciação de linhagens muito próximas e com características fenotípicas similares (Lucena, 2010).

O desenvolvimento de metodologias moleculares surgiu para contornar as limitações associadas com as técnicas de cultivo dos microrganismos em laboratório. Atualmente para estudos de comunidade microbiana tem se utilizado técnicas como à análise de restrição do rDNA amplificado (ARDRA), o polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição terminal (T-RFLP), a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), a amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), a eletroforese em gel de gradiente de temperatura (TGGE), além da análise do gene 16S rRNA (TORSVIK; ØVREAS, 2002).

O gene 16S rRNA, é um marcador genético, considerado universal, pois está presente em todos os seres vivos, este gene exibe nove regiões hipervariáveis, que são utilizadas como relógio molecular e permite inferir distâncias filogenéticas no estudo de diversas populações microbianas (Lucena, 2010; Almeida, 2017).

Além disso, uma das vantagens do uso do gene 16S de rRNA é a sua disponibilidade em bases de dados, que em sua grande maioria são gratuitos, o que facilita a comparação entre o banco de dados e novas sequências obtidas (Giaretta, 2010; Tarazi, 2010). Entretanto, foram relatadas algumas limitações como a descoberta da ocorrência de cópias em Bactérias e em *Archaea*, encontrando-se de 1 a 15 cópias do gene 16S rRNA em bactérias (Neves, 2016). Além por apresentar uma grande conservação a identificação de espécies de bactéria através, unicamente, do sequenciamento da região 16S apresenta um poder de resolução limitado (Lucena, 2010).

Apesar disso, o uso desse marcador tem contribuído principalmente para análise de comunidades microbiana em diversos ambientes como Mata Atlântica, Amazônia e Cerrado (Cenciani *et al.*, 2009; Faoro *et al.*, 2010). A utilização do gene 16S rRNA tem se mostrado muito importante para a ecologia microbiana, sendo possível investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas do meio ambiente (Almeida, 2017). No solo, a utilização do 16S rRNA, tem sido capaz de determinar os principais táxons bacterianos

(Silveira, 2004; Janssen, 2006). Além disso, esse método possui a vantagem de redução do tempo de análise, diminuição do custo do trabalho.

Novas técnicas baseadas no polimorfismo do DNA, tem surgido para se identificar e classificar microrganismos, como por exemplo a análise de sequencias repetitivas. Cinco por cento do genoma microbiano contém elementos repetitivos de DNA, são encontrados frequentemente em regiões intergênicas e extragênicas. Estas sequências de elementos mostram hipervariabilidade entre indivíduos, desta forma podem ser usados para gerar “impressões digitais” que são particulares para um indivíduo (Schneider, 1996; Ishii e Sadowsky, 2009).

A REP – PCR ou PCR de elementos palindrômicos repetitivos, é uma técnica considerada como extremamente confiável, reprodutível, rápida e altamente discriminatória (Versalovic *et al.*, 1994; Louws *et al.*, 1998). Essa técnica utiliza-se de “primers” complementares de sequências de DNA repetitivas presentes em múltiplas cópias no genoma bacteriano e altamente conservadas (Telino-Júnior, 2010; Ferreira, 2016; Melo, 2016; Neves, 2016). Existem três famílias de sequências repetitivas que são frequentemente identificadas, a REP-PCR (sequencias repetitivas extragênicas palindrômicas) com 35- 40bp, ERIC-PCR (sequências consenso intergênica repetitivas enterobacterianas) com 124-127bp e BOX-PCR (elemento BOX) com 154bp (Versalovic *et al.*, 1991; Versalovic *et al.*, 1994).

A Rep-PCR gera padrões que são susceptíveis a mudanças ao longo do tempo sendo provocadas por fatores que alteram a estrutura da genômica dos microrganismos, desta forma, as impressões digitais por rep-PCR podem ser usadas para avaliar a evolução do genoma microbiano e a filogenia molecular, além da plasticidade dos genomas microbianos (ISHII, 2009).

A técnica de Rep-PCR é aplicada para estudos de um amplo grupo de organismos, desde procariontes até mamíferos (Ramírez Castrillón, 2012), tem sido aplicada em estudos voltados para a classificação de patógenos humanos e vegetais, simbiontes de plantas, tem se mostrado de grande importância para estudos de ecologia microbiana, pois permite a classificação, identificação e da diversidade genética de microrganismos (Ishii, 2009, Rademaker, 1998). A Rep-PCR se mostrou uma ferramenta útil em estudos filogenéticos de bactérias fixadoras de nitrogênio e cepas do gênero *Nitrobacter* isolados de origens geográficas e ecofisiologicamente diferentes (Ishii, 2009).

A REP –PCR utilizando como iniciador o (GTG)₅ tem se mostrado uma ferramenta promissora para estudos de tipagem genética em diversos grupos bacterianos, estudos feitos com lactobacilos por Gevers *et al.* (2001), utilizando das técnicas REP-PCR, BOX-PCR e

(GTG)₅ - PCR, demonstrou que a (GTG)₅ -PCR foi a que apresentou os melhores resultados para tipagem de lactobacilos e outras bactérias lácticas em alimentos. Kheiri (2017), utilizou a (GTG)₅ -PCR e a BOX – PCR em estudos com E.coli e obteve resultados mais discriminativos para a tipologia de E. coli com o método (GTG)₅ -PCR em comparação com a BOX- PCR.

De Vuyst (2008), avaliou a técnica de (GTG)₅ -PCR fingerprinting para bactérias do ácido acético, e obteve resultados semelhantes aos de Gevers *et al.* (2001), obtendo padrões exclusivos para a maioria estirpes, o que permite indicar a utilidade desta técnica para identificação a nível de espécie e caracterização abaixo do nível de espécie para as cepas AAB. Ryberg (2011), também obteve resultados promissores para Cepas de Klebsiella, demonstrando que esse método parece ter o potencial de separar *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* isolados em agrupamentos específicos.

Esse método tem se mostrado uma ferramenta valiosa para a tipagem e identificação de diferentes grupos de bactérias e leveduras (Gao, 2018), por exemplo, *Staphylococcus* (Svec, 2010; Braem, 2011) ou lactobacilos (Lucena, 2010; Sharif, 2017).

Os fragmentos amplificados da REP-PCR geram identidades genômicas e permitem a diferenciação em nível de espécies, subespécies e cepa, se mostrando uma poderosa ferramenta para estudos de ecologia microbiana, microbiologia ambiental, diagnósticos moleculares, microbiologia médica e análises epidemiológicas (Ishii, 2009).

Existe pouca informação acerca da biodiversidade dos microrganismos presente no solo da Caatinga, são poucos os trabalhos que foram realizados para estimar a microbiota da Caatinga. Como os microrganismos são conhecidos por produzir uma ampla variedade de metabólitos como enzimas, antibacterianos, antifúngicos, antitumorais, antivirais, antinematódeos, anti-insetos, inibidores enzimáticos, imunossupressores, efetores de crescimento, pigmentos, vitaminas entre outros, o conhecimento da sua biodiversidade pode propiciar a busca por novas enzimas e substâncias bioativas para diversas aplicações biotecnológicas, constituindo assim uma importante alternativa para desenvolvimento econômico e social. O conhecimento da microbiota pode auxiliar nos trabalhos direcionados à conservação, reabilitação, práticas de manejo sustentável do solo no semiárido, já que são vulneráveis à degradação continuada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar a diversidade da comunidade microbiana em duas áreas da Caatinga no semiárido Paraibano.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Comparar a diversidade microbiana do solo entre duas áreas de proteção no semiárido.
- b) Avaliar a diversidade taxonômica de espécies bacterianas por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.
- c) Identificar os principais grupos de isolados bacterianos nas duas áreas de estudadas e quantificá-los.
- d) Validar a REP-Pcr para estudos de diversidade e ecologia microbiana.

3 METODOLOGIA

3.1 Área de coleta

Figura 1: Mapa das áreas de coleta amostrais.



Acervo GDBM

As amostras de solo utilizadas para este trabalho foram coletadas no semiárido paraibano: Área de Proteção Ambiental (APA) do Cariri ($7^{\circ}23'30''S$ e $36^{\circ}31'59''W$) localiza-se na microrregião do Cariri Paraibano. É uma sub-região do Planalto da Borborema oriental, que se encontra localizada na porção centro-sul do Estado e abrange os municípios de Cabaceiras, Boa Vista e São João do Cariri, possui uma área total de 18.560 ha e altitude média de 500 m, com precipitação média anual de 400 mm, delimitada por seis vértices, e por limites naturais constituídos por trechos do Rio Taperoá e Riacho Gangorra. A vegetação predominante é a caatinga arbustiva, que se encontra bastante alterada devido a longos anos de exploração, incluindo a retirada de lenha e caprinocultura (De Vasconcellos Barbosa, 2007).

E a Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Fazenda Tamanduá que se situa no município de Santa Terezinha, na Mesorregião do Sertão paraibano, Latitude $7^{\circ}2'20''S$ e Longitude $37^{\circ}26'43''W$, distante 18 km da cidade de Patos e 320 km da capital, João Pessoa. A RPPN possui uma área de 325 ha e não é explorada há mais de 30 anos, sendo a vegetação caracterizada como Caatinga arbustiva-arbórea fechada.

3.2 Isolamento das bactérias

As amostras de solo foram coletadas de forma aleatória em 10 parcelas de 100 m^2 , com distâncias de pelo menos 250 m, 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,

foram coletadas 10 amostras por área de coleta, entre as camadas 0 - 20 cm do solo, asépticamente em sacos plásticos esterilizados e transportadas para o laboratório à 4 ° C (Beltrão, 2014). Estas amostras foram utilizadas para análise física química e microbiológica do solo.

O isolamento seguiu metodologia de enriquecimento segundo Soares Jr. e colaboradores (2012). Para avaliar a população cultivável de bactérias foi utilizada uma alíquota de 1 mL de cada amostra e diluições seriadas foram realizadas na proporção 1:10.

Selecionamos a diluição 10^{-6} para prosseguir o isolamento. 100 uL da diluição 10^{-6} foram cultivados em triplicata meio de cultura TSB possuindo ágar 1,5% (Soares Jr *et al.*, 2012) acrescido de cicloheximidina (50 mg/mL) a 37°C por 48h. As colônias selecionadas foram purificadas por esgotamentos e mantidas em suspensões de glicerol estéril (20%) a -20°C.

Para estudo de abundância e densidade populacional, procedeu-se a contagem de UFC (Unidade Formadora de Colônia) nas 10 parcelas, resultantes das médias das triplicatas. Após a análise de abundância nas dez parcelas coletadas em cada área de estudo, procedeu-se a seleção aleatória das quatro parcelas de estudo por área, seguida da caracterização morfológica das colônias, analisando-se principalmente aspectos como forma, cor e tamanho, a fim de se obter dados sobre a diversidade bacteriana de cada parcela.

3.3 Identificação molecular

3.3.1 Extração de DNA

As células de bactérias foram cultivadas em tubos de plástico de 15 ml contendo 10 ml de meio de cultura a 37°C e utilizadas para extração de DNA a partir da metodologia modificada, descrita por Moreira e colaboradores (2005), sem o tratamento prévio das culturas bacterianas com cloreto de lítio.

O cultivo foi centrifugado a 4000 rpm por 10 min, desprezando-se o sobrenadante. O *pellet* foi ressuscitado em 1mL de água *milli Q*, transferido para um microtubo e centrifugado a 4000 rpm por 10 min. 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 10 min 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 10 min, 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 ressuspensionado 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.

3.3.2 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'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') (Lucena et al, 2010). Em volume final de 25µL contendo 0,2 pmol 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.

3.3.3 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 (Lucena et al., 2010).

As amplificações seguiram a programação de: 1 ciclo de desnaturação de 5 min à 95°C; 3 ciclos de desnaturação à 95°C por 1 min; 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.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Análise da Abundância

A contagem média de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de solo seco para a quantificação média da população bacteriana do solo da APA Cariri foi de 3.52×10^9 UFCs e da Fazenda Tamanduá foi de 2.43×10^9 . A comparação entre as duas áreas estudadas, demonstrou que não existe diferenças significativas quanto à abundância ($p = 0,1399$).

Segundo Cavalcante (2017), a microbiota do solo de regiões semiáridas é fortemente influenciada pelas condições adversas nestes ambientes, como altas temperaturas, recursos hídricos escassos, disponibilidade de nutrientes e de compostos químicos, todos esses fatores influenciam diretamente na composição das comunidades microbianas do solo.

Beltrão (2014) analisou as mesmas amostras de solo das quais utilizamos para estudos de identificação microbiológica e observou que o solo da APA Cariri apresentou maiores valores de matéria orgânica disponível e fósforo em comparação com os solos da Fazenda Tamanduá. A ocorrência de matéria orgânica favorece a maior aeração e disponibilidade de nutrientes, com conseqüente aumento na população bacteriana (Souto *et al.*, 2008). Sendo assim, um solo com teor elevado de matéria orgânica, tende a manter a população microbiana mais estável ao longo do ano, provavelmente, em decorrência da riqueza de nichos ecológicos, pela heterogeneidade das fontes de carbono (De Fede *et al.*, 2001; Grayston *et al.*, 2001). Balsler *et al.*, (2001) demonstra em seus estudos que a disponibilidade de carbono, fosforo e nitrogênio são fontes caracterizadas como limitantes e que podem influenciar na estrutura da comunidade bactérias.

Nossos dados de abundancia são maiores que os registrados por Gorlach-Lira e Coutinho (2007) que encontraram valores entre $10^6 - 10^7$ UFCs para bactérias totais em amostras de solo também na APA Cariri. Já na Fazenda Tamanduá, Souto *et al.* (2008) observou valores de 10^4 . Lima *et al.* (2014) estudou amostras do solo em diferentes tipos de vegetação do semiárido brasileiro para verificar a abundância de populações cultiváveis, encontrando a contagem média de 5×10^6 UFC/g na amostra da Caatinga natural. Portanto, podemos inferir que a diferença no que se refere a abundancia bacteriana registrada em nosso trabalho podem ser justificados devido a diferenças metodológicas, como a escolha da profundidade de 0-20 cm. Em condições naturais a população microbiana se concentra nas camadas superficiais do solo, sofrendo redução a partir dos 30 cm, em decorrência da redução nas trocas gasosas e disponibilidade de nutrientes (Carvalho, 2012). Entretanto, em solos da caatinga as camadas superficiais sofrem maiores perturbações devido à baixa umidade, altas temperatura e radiação solar.

Outra diferença metodológica, foi o uso da técnica de enriquecimento para o isolamento das bactérias, essa técnica tem como característica importante o aumento do número de bactérias tornando-as detectável (Tortora *et al.*, 2006), desta forma, pode ter favorecido nos maiores valores de abundância encontrados, já que Soares Jr *et al.* (2012), em solos da antártica e da caatinga utilizou o método de enriquecimento e encontrou uma maior abrangência de grupos bacterianos como organismos termotolerante, actinobactérias, bactérias esporulantes, bactérias com fluorescências e outras.

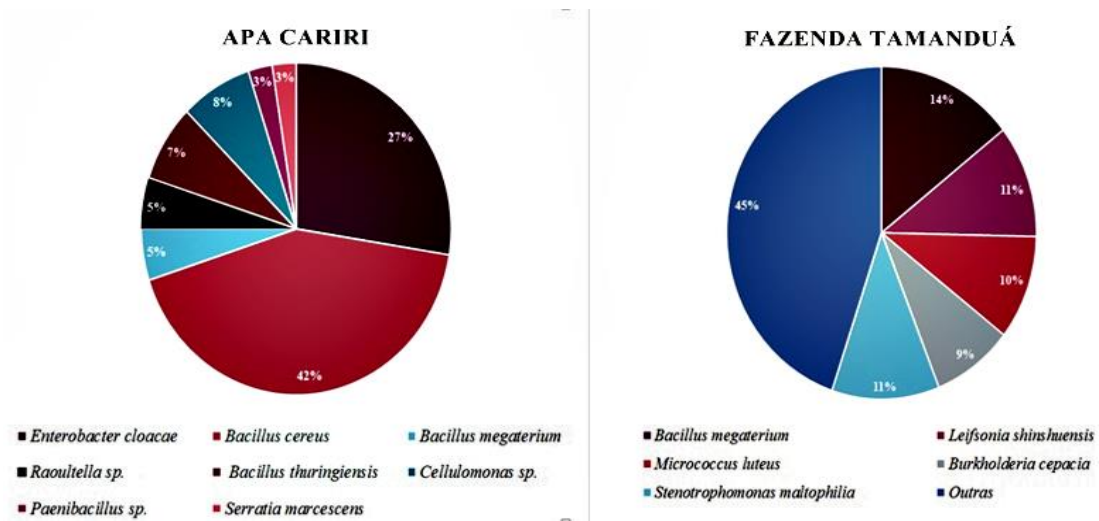
4.2 Estudo da diversidade

Os filos Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria normalmente são encontrados nos solos (Makhalanyane, 2015). Em solos da Amazônia central e Oriental Cannavan (2007; 2012), relatou a ocorrência dos filos, Bacteroidetes, Chlamydiae, Chloroflexi, Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Planctomycetes, Proteobacteria, Verrucomicrobia. Já na Mata Atlântica Massini (2009), estudando a bioprospecção de genes biossintéticos de policetídeos em DNA metagenômico detectou os filos, Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria.

A microbiota dos solos da Caatinga se comparado com solos de outros ecossistemas sofre maiores pressões ambientais, devido as flutuações extremas de temperatura, geralmente baixo nível de nutrientes, altos níveis de radiação ultravioleta incidente (UV), sendo assim espera-se um baixo número de espécies endêmicas, todavia, a diversidade taxonômica nos biomas de solos da Caatinga é surpreendente sendo mais diversa do que inicialmente foi assumido (Ferreira, 2010; Silva, 2015). Sendo assim, em nossos estudos foi possível detectar diferentes filos bacterianos nas amostras dos solos das duas áreas de proteção ambiental do semiárido, sendo eles, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria, o filo Bacteroidetes apareceu apenas na Fazenda Tamanduá. Estes resultados são similares a estudos anteriores em solos da Caatinga. Por exemplo, Taketani et al. (2015) em estudos com amostras de solo da rizosfera na região do semiárido do Brasil, encontrou abundância de Actinobacteria e Proteobacteria. Em solos desertificados da Caatinga, Ferreira (2016), relatou abundância dos filos Bacteroidetes, Firmicutes e Chloroflexi. Já Bononi (2016) avaliou o impacto da umidade do solo sobre a estrutura das comunidades bacterianas em solos da Caatinga e da Mata Atlântica, e relatou a dominância de Actinobacteria nos solos da Caatinga. Também em solos da Caatinga, Pacchioni et al. (2014) observou a maior frequência de Actinobacteria e Bacteroidetes.

Analisando especificamente a diversidade da APA Cariri e da Fazenda Tamanduá, foi possível observar que apesar da APA Cariri apresentar o maior número de unidades formadoras de colônias, ela apresentou uma diversidade de espécies menor que a Fazenda Tamanduá (Figura 2).

Figura 2: Espécies representativas da APA Cariri e Fazenda Tamanduá.

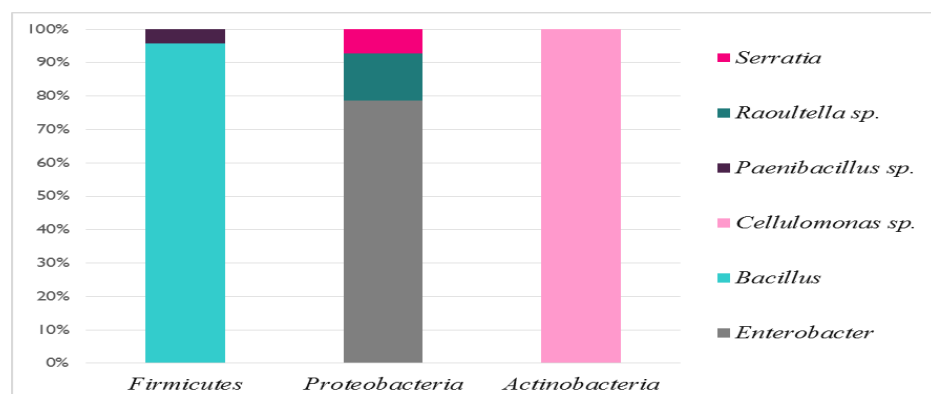


Acervo GDBM

4.2.1 Diversidade de espécies específicas da APA Cariri.

As espécies identificadas na APA Cariri foram: *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Paenibacillus sp.*, do filo Firmicutes; *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* e *Routella sp.*, do filo Proteobacteria e *Cellulomonas sp.* do filo Actinobacteria (Figura 3). Os gêneros *Bacillus*, *Enterobacter* e *Cellulomonas* foram os mais representativos dos filios Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria respectivamente.

Figura 3: Distribuição dos gêneros dominantes da APA Cariri.



Acervo GDBM

O gênero *Paenibacillus sp.*, assim como as espécies *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* são relatadas em ecossistemas com pouca disponibilidade de água, como o semiárido e o deserto. Essas espécies formam endósporos, favorecendo a ocorrência em ambientes secos, devido à resistência ao calor e à dessecação (Kavamura, 2012). O gênero

Paenibacillus sp., foi encontrada em solos alcalinos (Yoon et al., 2005), assim como em sedimentos Antárticos (Montes et al., 2004), e areia do deserto (Lim et al., 2006). Coba (2012), relatou a ocorrência das espécies *Paenibacillus apiarius*, *Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus polymyxa* e o gênero *Paenibacillus sp.*, a maior variedade de espécies encontrada por esse autor pode ser associada ao fato do estudo ser realizado em solos do Cerrado durante duas estações (úmida e seca). Em solos do Cariri, Grisi (2011), detectou a presença das espécies *Paenibacillus illinoisensis* e *Paenibacillus favisporus*, entretanto, as espécies identificadas por este autor foram previamente selecionadas quanto a produção de celulases e xilanases, podendo favorecer a identificação destes organismos.

A espécie *Bacillus cereus* foi mais predominante no solo da APA Cariri. Soares Jr. e colaboradores (2012) selecionou bactérias celulolíticas da Caatinga na região de Canindé (Ceará) e o grupo de maior abundância também foi *Bacillus*. A maior representatividade de *Bacillus* também foi exibida por Kavamura (2013), em estudos de solos e rizosfera de bactérias associadas às cactáceas da Caatinga. Contudo, este autor realizou coletas durante dois períodos (chuvoso e seco) e para a obtenção de bactérias com crescimento em meio com atividade reduzida de água, utilizou da adição de sorbitol ao meio de cultura, desta forma pode ter favorecido a ocorrência de espécies com formação de endósporos.

O gênero *Cellulomonas sp.* também foi isolado por Ding et al. (2013) e Kheta Ram (2012). Contudo, Ding et al. (2013) realizou a identificação voltada para actinobacterias e em ecossistemas desérticos. Já Kheta Ram (2012) isolou as cepas de *Cellulomonas sp.* em diferentes solos de florestas.

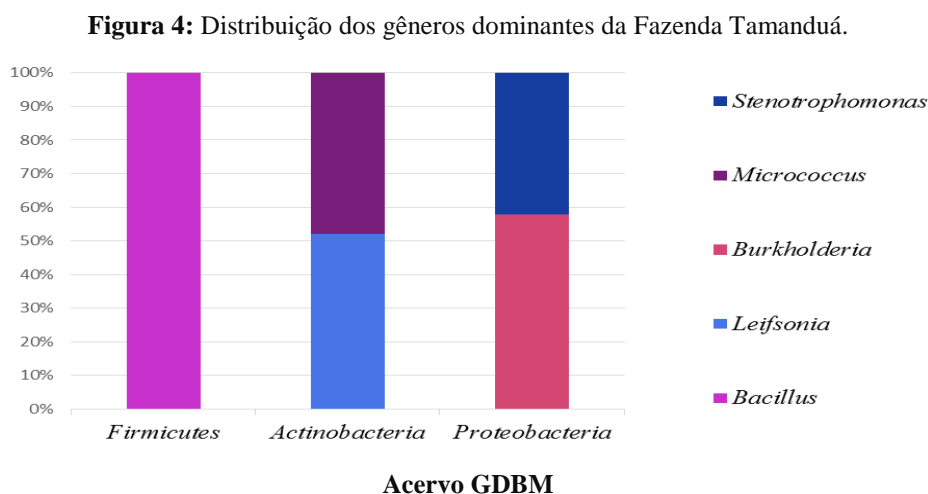
Da Cruz Filho (2013) relata a ocorrência de *Serratia marcescens* em solos associadas a plantas. Coba (2012), em solos do Cerrado durante duas estações (úmida e seca), também isolou a espécie *Serratia marcescens*, a escolha da coleta nas duas estações pode ter favorecido a presença dessa espécie. Em estudos de solos e rizosfera de bactérias associadas às cactáceas da Caatinga, durante duas estações (úmida e seca), Kavamura (2013) identificou o gênero *Serratia sp.*, entretanto, para a obtenção de bactérias com crescimento em meio com atividade reduzida de água, utilizou da adição de sorbitol ao meio de cultura.

Sato (2011) relata a ocorrência de *Enterobacter cloacae* na fixação de nitrogênio simbiótico em plantas e na produção de hormônios de crescimento vegetal. Grisi (2011), analisou o solo de pastagem nativa no Cariri paraibano e identificou sequencias pertencentes a família *Enterobacteriaceae*. Em estudos com microrganismos rizosféricos, endorizosféricos e endofíticos de várias espécies vegetais de desertos ao norte de Sinai, Hanna et al. (2012) detectou a presença de *Enterobacter cloacae*. Coba (2012), identificou as espécies *Enterobacter*

aerogenes, *Enterobacter sp.*, e Mesquita (2011), identificou a espécie *Enterobacter Cowanii*, e o gênero *Enterobacter sp.* em solos do Cerrado, que são os que apresentam as características mais próximas as da Caatinga.

4.2.2 Diversidade de espécies específicas da Fazenda Tamanduá.

As espécies mais representativas da Fazenda Tamanduá foram: *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, pertencentes ao filo Proteobacteria; *Bacillus megaterium*, pertencente a Firmicutes; *Micrococcus luteus*, *Leifsonia shinshuensis*, pertencentes ao filo Actinobacteria (Figura 4). O gênero *Bacillus*, *Burkholderia* foram os mais representativos dos filios Firmicutes e Proteobacteria.



Sabendo que as plantas podem hospedar comunidades microbianas específicas quando crescidas juntas no mesmo solo, os microrganismos podem desempenhar função ecológica que concedem benefícios as plantas como a melhoria das propriedades físicas do solo, auxílio na agregação do solo pela produção de exopolissacarídeos e biofilme (Kavamura, 2012). Sendo assim, *Stenotrophomonas maltophilia*, possui capacidade de se aderir superfícies através de fímbrias (Ryan, 2009), podem desta forma se aderir a partículas do solo e formar agregados celulares e biofilmes, a presença de fatores de fixação às partículas do solo, podem ser estratégias que promovem a proteção de predadores e condições de estresse, como as que são submetidas nos solos da caatinga (Caesar-Tonthat et al., 2007; Neves, 2016). Essa espécie foi encontrada por Park et al. (2005), com alta atividade de nitrogenases na rizosfera de sete diferentes plantas da Coreia. Chowdhury (2007) encontrou *Stenotrophomonas maltophilia* associada a vegetação do solo do deserto de Thar na Índia.

Nos solos da Fazenda Tamanduá isolamos a espécie *Burkholderia cepacia*. Lester (2007), também isolou essa espécie, entretanto, foi da microflora de solos áridos do deserto de Atacama. Em solos do Cariri paraibano, Grisi (2011), detectou a presença da ordem *Burkholderiales*. Kavamura (2013), em estudos de solos e rizosfera de bactérias associadas às cactáceas da Caatinga identificou o gênero *Burkholderia*. Contudo, este autor realizou coletas durante dois períodos (chuvoso e seco).

A espécie *Bacillus megaterium* foi a de maior predominância no solo da Fazenda Tamanduá. Coba (2012), relatou a ocorrência das espécies *Bacillus acidiceler*, *Bacillus cereus*, *Bacillus drentensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus simplex*, *Bacillus sp.*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus luciferensis*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus simplex*, a maior variedade de espécies encontrada por esse autor pode ser associada ao fato do estudo ser realizado em solos do Cerrado e durante duas estações (úmida e seca). Kavamura (2013), em estudos de solos e rizosfera de bactérias associadas às cactáceas da Caatinga, encontrou uma grande diversidade de *Bacillus*, sendo eles, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sp.*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, contudo, este autor analisou amostras de solo de duas estações (úmida e seca) e para a obtenção de bactérias com crescimento em meio com atividade reduzida de água, utilizou da adição de sorbitol ao meio de cultura, desta forma pode ter favorecido a ocorrência de *Bacillus* que é caracterizada por formação de endósporos, que são estruturas que são mais resistentes as características da Caatinga.

A espécie *Leifsonia shinshuensis* identificado no solo da Fazenda Tamanduá. Silva (2012), também isolou essa espécie, entretanto, este autor realizou estudos voltados para a identificação de actinobactérias em outro tipo de solo, o do cerrado, e durante estação de baixa pluviosidade, já nossos estudos foram realizados nos solos do semiárido e durante a estação de seca. Hao e colaboradores (2008) analisaram a composição e diversidade da comunidade bacteriana Rhizosfera de *Taxus*, e também relatou a presença dessa espécie.

Micrococcus luteus também foi identificada na Fazenda Tamanduá, e a sua ocorrência tem sido relatada em associação com plantas (Reginatto, 2008; Specian, 2014), ou em solos diferentes do utilizado para nosso estudo, como solos da serapilheira de Mata Atlântica (Gonçalves, 2006) e em gramíneas perenes, tolerante à seca, endêmica do deserto de Thar, no Rajastão, na Índia (Chowdhury, 2007).

4.3 Análise Intraespecífica

Sabendo que o polimorfismo de elementos repetitivos REP-PCR *fingerprinting* gera um perfil específico para cada cepa estudada, a utilização desse método tem contribuído para identificar, compreender e caracterizar a diversidade genética de espécies, além de contribuir no reconhecimento de linhagens distintas.

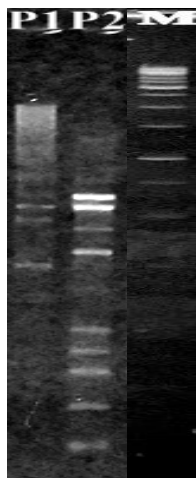
Os elementos repetitivos parecem estar localizados em distintas regiões intergênicas do genoma, em ambas orientações, acredita-se que, por serem associadas a graus elevados de polimorfismos, essas regiões tenham uma participação em processos de evolução adaptativa, mediando a interação dos microrganismos com ambientes inóspitos ou adversos (Da Silva, 2013). Desta forma, o conhecimento de dados moleculares detalhados sobre a diversidade de comunidades microbianas pode nos ajudar a entender a diversidade dos microrganismos em seu ambiente natural.

As espécies mais representativas na APA Cariri foram: *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*; *Enterobacter cloacae*, e *Celullomonas sp.* Já na Fazenda Tamanduá as espécies dominantes foram: *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Leifsonia shinshuensis*. As espécies *Bacillus megaterium*, *Enterobacter cloacae* e *Bacillus cereus* ocorreram nas duas áreas, desta forma, decidimos então avaliar a diversidade genética a nível intraespecífico dos isolados bacterianos mais predominantes, utilizando o primer GTG₅.

4.3.1 Espécies exclusivas da APA Cariri

Os isolados do gênero *Cellulomonas sp.* foram identificados apenas na APA Cariri e apresentou 2 perfis genéticos distintos (Figura 5), sendo encontrada apenas na parcela 6. A ocorrência destes perfis distintos entre os isolados pode indicar a existência de linhagens diferentes de um mesmo gênero.

Figura 5: Perfis de Rep-PCR obtidos das espécies exclusivas da APA Cariri.
(P1-P2: numeração dos perfis identificados, M- Marcador molecular 1Kb) (- Eletroforese dos isolados identificados como *Cellulomonas sp.*)



Acervo GDBM

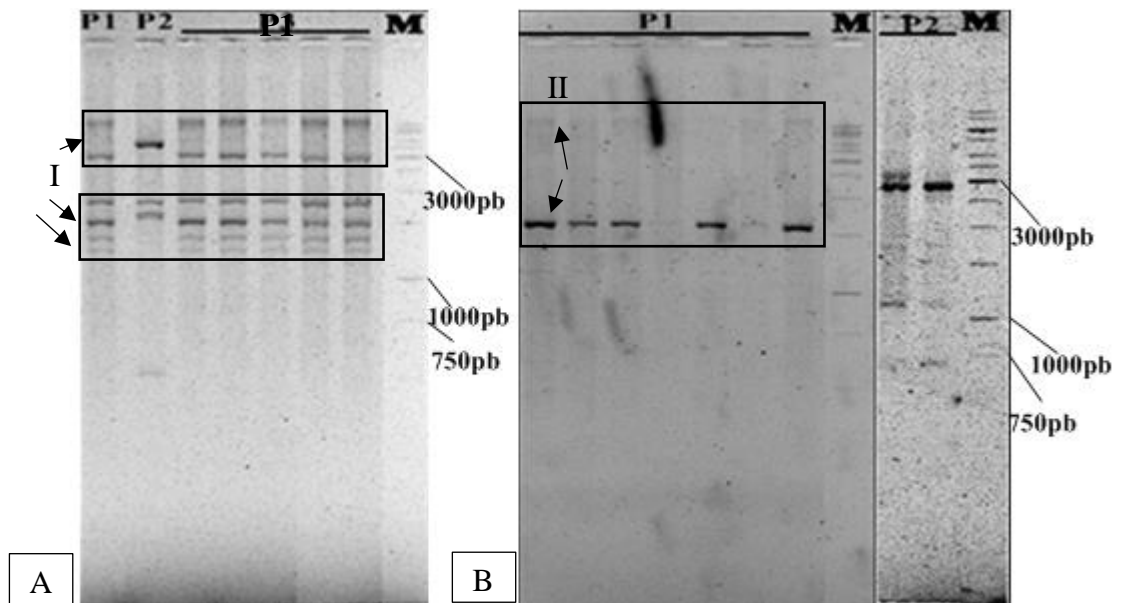
4.3.2 Espécies exclusivas Fazenda Tamanduá

Os isolados identificados como *Burkholderia cepacia*, *Micrococcus luteus* e *Stenotrophomonas maltophilia* foram encontradas apenas na Fazenda Tamanduá e foram predominantes nas parcelas 7, 9 e 5 respectivamente. *Burkholderia cepacia* apresentou 2 perfis distintos (Figura 6), essa espécie foi caracterizada pela presença do padrão de bandas (I). *Micrococcus luteus* apresentou 2 perfis distintos (Figura 6) e foi caracterizada pela presença do padrão de bandas (II) em quase todos os perfis, exceto no perfil 2 (P2) e *Stenotrophomonas maltophilia* resultou em 5 perfis distintos, sendo o padrão de bandas (III) comum a quase todas os perfis, com exceção do perfil 6 (P6) (Figura 7).

As espécies *Burkholderia cepacia*, *Micrococcus luteus*, *Stenotrophomonas maltophilia* apresentaram heterogeneidade de seus perfis de *fingerprinting*, sugerindo que podem existir diferentes linhagens dessas espécies, além disso foi possível indicar possíveis padrões de bandas específicos a cada espécie analisadas.

Figura 6: Perfis de Rep-PCR obtidos das espécies exclusivas Fazenda Tamanduá.

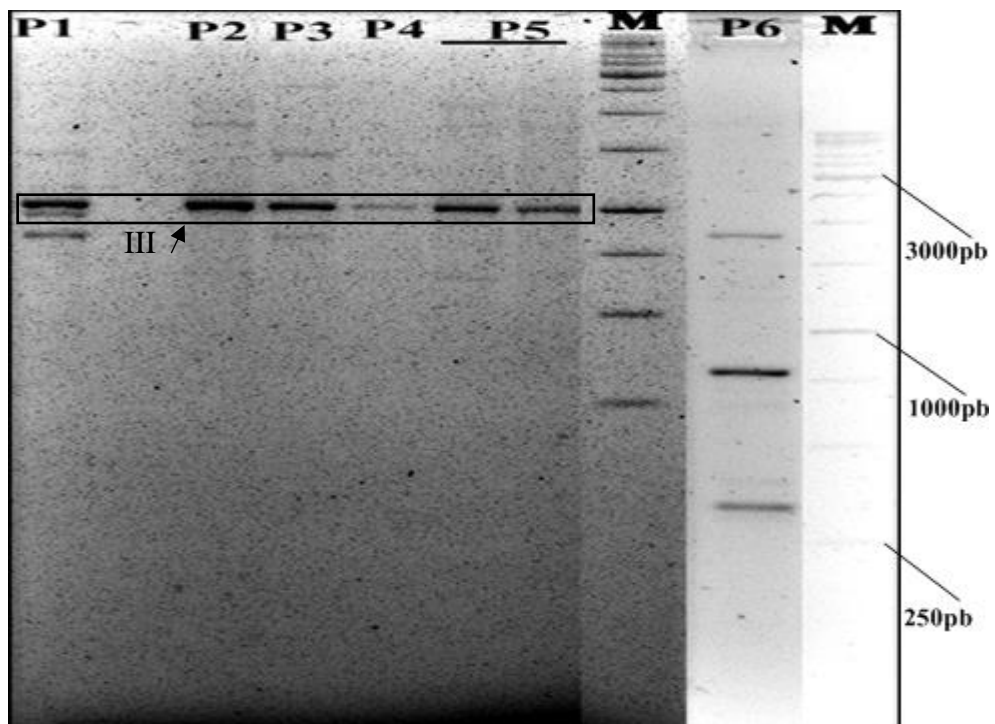
(P1-P3: numeração dos perfis identificados, M- Marcador molecular 1Kb) (a - Eletroforese dos isolados identificados como *Burkholderia cepacia*; b – Eletroforese dos isolados identificados como *Micrococcus luteus*).



Acervo GDBM

Figura 7: Perfis de Rep-PCR obtidos das espécies exclusivas Fazenda Tamanduá.

(P1-P6: numeração dos perfis identificados, M- Marcador molecular 1Kb) (Eletroforese dos isolados identificados como *Stenotrophomonas maltophilia*)



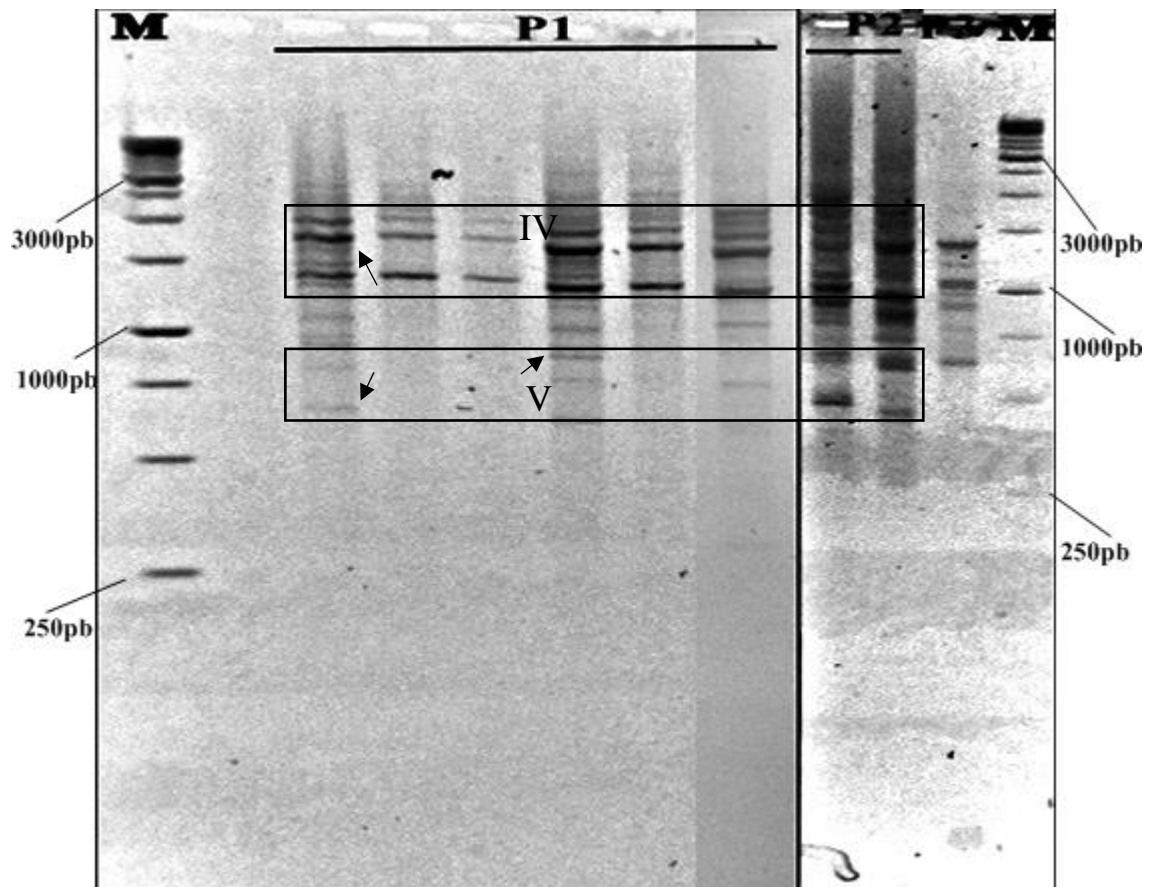
Acervo GDBM

4.3.3 Espécies encontradas nas duas áreas

A espécie *Enterobacter cloacae* e *Bacillus megaterium* foram comuns nas duas áreas. Os isolados identificados como *Enterobacter cloacae* apresentaram 3 perfis distintos (Figura 8) onde os padrões de bandas (IV e V) foram comuns para todas as amostras com exceção do perfil 3 (P3), apenas o perfil 2 (P2) ocorreu nas duas áreas, sugerindo a existência de uma mesma linhagem. Os perfis 1 (P1) e 3 (P3) foram exclusivos da APA cariri. Os isolados de *Bacillus meagaterium* apresentaram 8 perfis distintos (Figura 9), o perfil 9 (P9) perfil 10 (P10) só ocorreram na APA cariri, os demais perfis foram específicos da Fazenda Tamanduá, o padrão de banda (VI) foi comum apenas aos perfis 1,2,3,4 (P1, P2, P3 e P4) já o padrão (VII) foi comum apenas ao perfil 6 (P6).

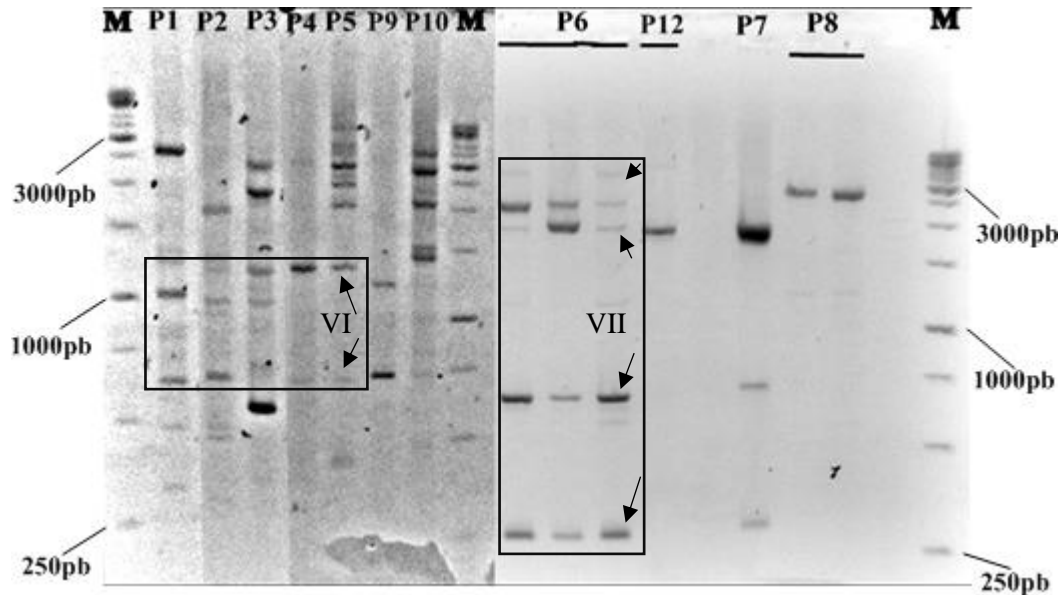
Figura 8: Perfis de Rep-PCR obtidos das espécies encontradas nas duas áreas.

(P1-P3: numeração dos perfis identificados, M- Marcador molecular 1Kb) (Eletroforese dos isolados identificados como *Enterobacter cloacae*).



Acervo GDBM

Figura 9: Perfis de Rep-PCR obtidos dos isolados da Fazenda Tamanduá e APA CARIRI (P1-P8: numeração dos perfis identificados, M- Marcador molecular 1Kb) (Eletroforese dos isolados identificados como *Bacillus megaterium*).



Acervo GDBM

Os isolados identificados como *Bacillus thuringiensis* apresentaram 4 perfis distintos (P1, P2, P3 e P4), onde o padrão de banda (VIII) foi comum a todos os perfis amostrados (Figura 10), desta forma podemos indicar a ocorrência de linhagens distintas nos solos da APA Cariri, a espécie *Bacillus cereus* apresentou 11 perfis distintos (Figura 10), onde os perfis 2,7,8 e 9 são exclusivos da FT, já os perfis 1,3,4,5,6,10 e 11 são exclusivos da APA Cariri, indicando uma possível variabilidade genética, o padrão de banda (IX) foi comum a todos os perfis de *Bacillus cereus*, podendo ser considerado um padrão específico da espécie, já o padrão (X) foi comum apenas aos perfis 1,2,3,4,5,6 e 12.

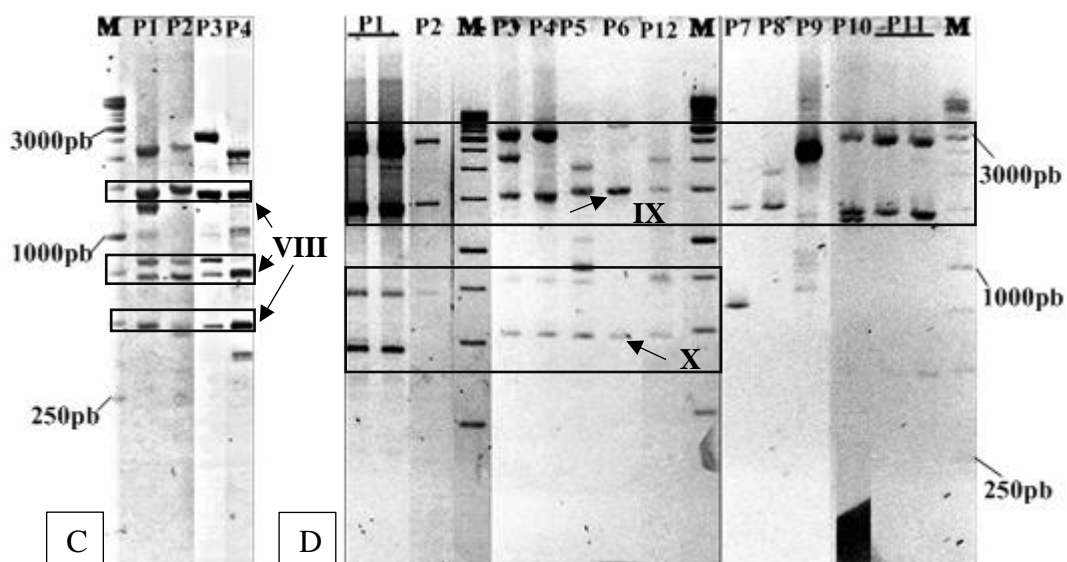
Bacillus cereus e *Bacillus thuringiensis*, pertencem ao gênero *Bacillus*, que possuem a capacidade de produção de esporos (Silveira, 2008), em condições ambientais adversas como as da Caatinga, onde os fatores ambientais estão em constante variação, essa estratégia pode ser um fator essencial para a sobrevivência dessas espécies neste tipo de ambiente, assim, a presença de perfis genéticos distintos podem indicar diferenciadas resposta a esse ambiente. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus anthracis* são bactérias Gram-positivas, em forma de bastonete, formadoras de esporos, que pertencem ao grupo *B. cereus*, são encontradas em diversos ambientes no solo (Ticknor, 2001). A diferenciação entre as linhagens de *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* tem sido feita através da presença de genes que codificam as toxinas inseticidas em *Bacillus thuringiensis*, normalmente encontrados em plasmídeos, a

problemática é que se esses plasmídeos forem perdidos não será possível uma distinção entre as linhagens (Helgason, 2000; Ticknor, 2001). Abordagens moleculares recentes como a eletroforese de enzimas multilocus, o sequenciamento de genes discretos codificadores de proteínas (Helgason *et al.*, 2000), revelaram extensas semelhanças entre genomas de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus* e apontaram poucas diferenças consistentes (Han, 2006), por isso os resultados ainda são conflitantes (Cherif, 2003; Peruca, 2008).

Embora a diferenciação das espécies *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus*, seja relativamente difícil, através da técnica de REP-PCR conseguimos distinguir as duas cepas e inferir que são possivelmente espécies distintas.

Figura 10: Perfis de Rep-PCR obtidos dos isolados da APA CARIRI.

(P1-11: numeração dos perfis identificados, M- Marcador molecular 1Kb) (c - Eletroforese dos isolados identificados como *B. thuringiensis*; d- Eletroforese dos isolados identificados como *B. cereus*).



Acervo GDBM

Desta forma, através da técnica Rep-PCR, utilizando o *primer* GTG₅ foi possível obter perfis genéticos distintos para essa comunidade, sendo possível observar que as espécies que ocorreram em ambas as áreas, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus cereus* revelaram maior diversidade intra-espécifica, podendo ser associada ao fato dessas espécies serem submetidas a maiores pressões ambientais, além disso, por meio dos perfis de Rep-PCR observamos perfis específicos das espécies bacterianas avaliadas em cada área estudada. O conhecimento dessa diversidade é importante para o conhecimento da diversidade genética das espécies do solo dessa região, já que se sabe tão pouco sobre a microbiota nativa do solo da Caatinga, dada as condições geológicas, químicas e físicas severas dos solos semiárido, espera-

se que a microbiota desse solo seja altamente especializada. A descoberta dessa diversidade contribui para o conhecimento do perfil funcional das espécies, assim como sua distribuição ecológica e induz a busca de novas enzimas e substâncias bioativas para diversas aplicações biotecnológicas, além de ser útil para estudos de conservação e manejo dessa região.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de não apresentar diferença significativa nos valores de abundância, as duas áreas apontam para diferenças na diversidade de espécies, que será confirmado com estudos estatísticos.

Foi possível ver que a Fazenda tamanduá apresentou uma maior diversidade de espécies em comparação com a APA Cariri, podemos observar ainda a presença de espécies específicas a cada área amostral, como a presença de *Bacillus thuringiensis*, *Paenibacillus sp*, *Serratia marcescens* e *Routella* e *Celullomonas* apenas na APA Cariri e *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Micrococcus luteus* e *Leifsonia shinshuensis* apenas na Fazenda Tamanduá.

Em nossos estudos, foram obtidos diferentes perfis genotípicos dos isolados caracterizados, demonstrando que a técnica de rep-PCR pode ser utilizada como marcador intra-específico, sendo útil nos estudos de ecologia microbiana

Sugere-se que diferentes linhagens de *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Cellulomonas sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Micrococcus luteus*, podem estar presentes nas áreas estudadas. Trabalhos futuros visam correlacionar os isolados com diferentes perfis intra-específico com mecanismos adaptativos desenvolvidos por estes, o que pode contribuir para estudos de preservação e manejo desses ecossistemas.

Além disso, este é um trabalho pioneiro que aborda a diversidade edáfica de duas áreas no semiárido paraibano. Esse trabalho mostrou uma grande diversidade de espécies com potencial biotecnológico, propício à prospecção de produtos bioativos.

6 REFERÊNCIAS

AJEET, K. *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.

ALMEIDA, W. E. S. **Caracterização parcial do gene 16S rRNA de isolados do solo e seus potenciais na solubilização de fostato e influência no crescimento de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*).** 48 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017.

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.

ALVES, J. J. A. **Caatinga do Cariri paraibano.** *Revista Geonomos*, v. 17, n. 1, 2013.

ARAÚJO, J. F. D. **Diversidade bacteriana do solo em diferentes fitofionomias do bioma cerrado e perspectivas biotecnológica.** 153 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas, Genética Molecular e de Populações, Biotecnologia Molecular) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2011.

BALSER, T. C. **The impact of long-term nitrogen addition on microbial community composition in three Hawaiian forest soils.** *The Scientific World Journal*, v. 1, p. 500-504, 2001.

BAREA, J. M., POZO, M. J., AZCON, R., & AZCON-AGUILAR, C. **Microbial co-operation in the rhizosphere.** *Journal of experimental botany*, v. 56, n. 417, p. 1761-1778, 2005.

BELTRÃO, M. G. **Biomassa aérea no semiárido da Paraíba, Brasil.** 85p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, 2014.

BONONI, L. **Impacto da umidade do solo sobre a estrutura das comunidades bacterianas e sobre as atividades enzimáticas em solos da Caatinga e da Mata Atlântica.** Dissertação (Tese de Doutorado – Embrapa / Meio Ambiente). Universidade de São Paulo, 2016.

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. 1-2, p. 67-74, 2011.

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.

CARVALHO, Y. D. **Densidade e atividade dos microrganismos do solo em plantio direto e convencional, na região de Carambeí-PR.** Dissertação (mestrado em ciências agrárias) - Universidade Federal do Paraná, 2012.

CAVALCANTE, F. G.; MARTINS, C. M.; SILVEIRA, S. C. **Interações bióticas entre actinobactérias e rizóbios em solos da região semiárida brasileira.** *Centro Científico Conhecer - Goiânia*, v.14 n.26; p. 2017 1011, 2017.

CENCIANI, K. *et al.* **Bacteria diversity biomass in forest, pasture and fallow soil in the southwestern Amazon Basin.** *R. Bras. Ci. Solo*, v. 33, p. 907-916, 2009.

CHANAL, A. *et al.* **The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria.** *Environmental Microbiology*, v. 8, n. 3, p. 514-525, 2006.

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.

CHERIF, A. *et al.* **Genetic relationship in the ‘*Bacillus cereus* group’ by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, n. 6, p. 1108-1119, 2003.

CHOWDHURY, S. P. *et al.* **Identification of diazotrophs in the culturable bacterial community associated with roots of *Lasiurus indicus*, a perennial grass of Thar Desert, India.** *Microbial ecology*, v. 54, n. 1, p. 82-90, 2007.

COBA, M. S. M. **Diversidade de Bactérias cultiváveis do solo do Cerrado brasileiro.** 2011. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

COSTA, K. C. *et al.* **Flora vascular e formas de vida em um hectare de caatinga no Nordeste brasileiro.** *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 4, n. 1, 2009.

DA CRUZ FILHO, R. F., & TEIXEIRA, M. F. S. **Avaliação do potencial biotecnológico de pigmentos produzidos por bactérias do gênero *Serratia* isoladas de substratos amazônicos.** Espaço Científico Livre Projetos Editoriais. 2013.

DA SILVA, E. C. *et al.* **Aspectos ecofisiológicos de dez espécies em uma área de caatinga no município de Cabaceiras, Paraíba, Brasil.** Iheringia. Série Botânica., v. 59, n. 2, p. 201-206, 2004.

DA SILVA, M. A. P. *et al.* **Diversidade de rizóbios na estruturação de comunidade de plantas em solos de Floresta Atlântica.** Anais da Semana Científica Johanna Döbereiner, 2013.

DE ALBUQUERQUE, U. P. *et al.* **Caatinga revisited: ecology and conservation of an important seasonal dry forest.** The Scientific World Journal, v. 2012.

DE FEDE, K. L. *et al.* **Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size-fractionated soil bacteria by BIOLOG® community-level physiological profiles and restriction analysis of 16S rRNA genes.** Soil Biology and Biochemistry, v. 33, n. 11, p. 1555-1562, 2001.

DE MELLO, C. M. A., DA SILVA, I. R., DE PONTES, J. S., GOTO, B. T., DA SILVA, G. A., & MAIA, L. C. **Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em área de Caatinga, PE, Brasil.** Acta Botânica Brasílica, v. 26, n. 4, p. 938-943, 2012.

DE VASCONCELLOS BARBOSA, M. R. **Vegetação e flora no Cariri Paraibano.** Oecologia brasiliensis, v. 11, n. 3, p. 313-322, 2007.

DE VUYST, L. *et al.* **Validation of the (GTG) 5-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans.** International journal of food microbiology, v. 125, n. 1, p. 79-90, 2008.

DEUNER, C. C., DE SOUZA, R. M., ZACARONI, A. B., DOS REIS FIGUEIRA, A., & CAMERA, J. N. **Sensibilidade do método de obtenção das células bacterianas e da técnica de PCR para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão.** Summa Phytopathologica, v. 38, n. 1, p. 48-53, 2012.

DING, D. *et al.* **Culturable actinomycetes from desert ecosystem in northeast of Qinghai-Tibet Plateau.** Annals of microbiology, v. 63, n. 1, p. 259-266, 2013.

EUZÉBY, J.P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**. 1997-present.

FAORO, H. *et al.* **Influence of Soil Characteristics on the Diversity of Bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest**. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 76, p. 4744-4749, 2010.

FERREIRA, A. C. A. **Ecologia e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em área da caatinga**. 88p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. 2010.

FERREIRA, P. R. S. **Caracterização da diversidade bacteriana de solos da caatinga (Ceará) de áreas preservadas e sob condições de desertificação**. Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira – UNILAB. 2016.

FRECHAUT, T. I. P. **Validação de metodologia para detecção de *Bacillus cereus* em arroz e produtos à base de cereais**. Dissertação (Mestrado) em Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia de Lisboa, 2014.

GAO, W.; Zhang, L. **Genotypic diversity of bacteria and yeasts isolated from Tibetan kefir**. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 53, n. 6, p. 1535-1540, 2018.

GEVERS, D. *et al.* **Re-evaluating prokaryotic species**. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 9, p. 733, 2005.

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.

GIARETTA, D. R. *et al.* **ITS-rDNA phylogeny of *Colletotrichum spp.* causal agent of apple glomerella leaf spot**. *Ciência Rural*, v. 40, n. 4, p. 806-812, 2010.

GONÇALVES, V. A. **Caracterização da comunidade bacteriana do solo da Mata Atlântica produtora de substâncias de interesse biotecnológico**. 65 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de Mogi Das Cruzes, São Paulo, 2006.

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.

GRAYSTON, S. J. *et al.* **Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems**. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 33, n. 4-5, p. 533-551, 2001.

GRISI, T. C. S. D. L. **Diversidade de Bacteria e Archaea do solo do Cariri paraibano e prospecção de celulases e xilanases em clones metagenômicos e isolados bacterianos.** 213 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

HAN, C. S. *et al.* **Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*.** *Journal of bacteriology*, v. 188, n. 9, p. 3382-3390, 2006.

HANNA, A.L.; YOUSSEF, H.H.; AMER, W.M.; MONIB, M.; FAYEZ, M.; HEGAZI, N.A. **Diversity of bacteria nesting the plant cover of north Sinai deserts, Egypt.** *Journal of Advanced Research, Cairo*, 2012.

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.

HELGASON, E. *et al.* ***Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence.** *Applied and environmental microbiology*, v. 66, n. 6, p. 2627-2630, 2000.

HILL, G. T. *et al.* **Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities.** *Applied soil ecology*, v. 15, n. 1, p. 25-36, 2000.

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 bacterial taxa in 16S rRNA and 16S rRNA gene libraries.** *Microbiologia Aplicada e Ambiental*, 2006.

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).

KHEIRI, R. *et al.* **Clonal Heterogeneity and Efficacy of BOX and (GTG)₅ Fingerprinting Methods for Molecular Typing of *Escherichia coli* Isolated from Chickens in IRI.** *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, v. 23, n. 2, p. 219-225, 2017.

KHETA RAM, T. **ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Cellulomonas spp.* FROM DIFFERENT SOIL HABITATS.** Tese (Doutorado). University of Agricultural Sciences GKVK, Bangalore, 2012.

KLACZKO, L. B., & VIEIRA, R. D. **Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do brasil.** 2003

KOCUR, M.; KLOOS, E. W.; SCHLEIFER, K. **The genus *Micrococcus*.** In: **The Prokaryotes.** Springer New York, 2006. p. 961-971, 2006.

LEAL, I. R., SILVA, J. D., TABARELLI, M., & LACHER JR, T. E. **Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil.** Megadiversidade, v. 1, n. 1, p. 139-146, 2005.

LESTER, E. D.; SATOMI, M.; PONCE, A. **Microflora of extreme arid Atacama Desert soils.** Soil Biology and Biochemistry, v. 39, n. 2, p. 704-708, 2007.

LIM, J.-M. *et al.* ***Paenibacillus gansuensis* sp. nov., isolated from desert soil of Gansu Province in China.** International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 56, n. 9, p. 2131-2134, 2006.

LIMA, J. V. L. **Populações microbianas e antagonismo de actinobactérias sobre rizóbios em solos do semiárido.** Dissertação (mestrado em ecologia e recursos naturais) - Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2017.

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, n. 18, p. 2300-2316, 2014.

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.

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.

MELO, R. K. A. F., & AXIOLE, N. M. C. **Aspectos gerais do bioma caatinga.** Caderno de estudos avançados em desenvolvimento sustentável do semiárido-ceades, v. 1, n. 1, p. 73-78, 2016.

MESQUITA, V. A. **Caracterização da diversidade microbiológica de solo do Cerrado de Minas Gerais por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

MOHAMMADIPANAH, F.; WINK, J. **Actinobacteria from arid and desert habitats: diversity and biological activity.** *Frontiers in microbiology*, v. 6, p. 1541, 2016.

MONTEIRO, M. C. P. **Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado.** (Tese de Doutorado. Master Thesis). Universidade Federal de Lavra, Brasília. 2012.

MONTES, M. J., MERCADÉ, E., BOZAL, N., & GUINEA, J. ***Paenibacillus antarcticus sp. nov.*, a novel psychrotolerant organism from the Antarctic environment.** *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 54, n. 5, p. 1521-1526, 2004.

MORAIS, M. **Diversidade bacteriana do solo sob cultivo de cana-de-açúcar.** 2008. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006.

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.

MUNIZ, P. H. P. C. *et al.* **Influência de diferentes manejos e coberturas vegetais na atividade microbiana do solo.** *Anais da Semana de Ciências Agrárias e Jornada de Pós-graduação em Produção Vegetal* (ISSN 2594-9683), v. 14, p. 100-104, 2018.

NAKATANI, A. S. *et al.* **Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de Landfarming de resíduos petroquímicos.** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, n. 4, p. 1501-1512, 2008.

NASCIMENTO, L. R. S. **Diversidade de isolados bacterianos e sua influência na FBN em diferentes coberturas vegetais.** 109 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2013.

NEILSON, J. W. *et al.* **Life at the hyperarid margin: novel bacterial diversity in arid soils of the Atacama Desert, Chile.** *Extremophiles*, v. 16, n. 3, p. 553-566, 2012.

NEVES, A. G. D. **Identificação molecular de bactérias edáficas em uma área de preservação no semiárido paraibano.** Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2016.
OLIVEIRA, D. A. *et al.* **Caracterização química do solo em uma área de implantação do projeto de recuperação de áreas degradadas da Jica no município de Pedro Avelino-RN.** *Revista Caatinga*, v. 21, n. 1, p. 179-188, 2008

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.

PARK, M. *et al.* **Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea.** *Microbiological Research*, v. 160, n. 2, p. 127-133, 2005.

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

PEREIRA JÚNIOR, L. R., DE ANDRADE, A. P., & ARAÚJO, K. D. **Composição florística e fitossociológica de um fragmento de caatinga em Monteiro, PB.** *Holos*, v. 6, 2012.

PERUCA, A. P. S.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N. **Genetic relationships between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*, as revealed by rep-PCR genomic fingerprinting.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 5, p. 497-500, 2008.

RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, FRANK J.; DE BRUIJN, F. J. **Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting.** *Molecular microbial ecology manual*, v. 3, n. 3, p. 1-27, 1998.

RAMÍREZ CASTRILLÓN, M. **Tipagem molecular de leveduras associadas a vinhos do sul do Brasil: padronização de MSP-PCR Fingerprinting.** Dissertação (Mestrado)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, 2012.

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.

RANJARD, L., & RICHAUME, A. **Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil.** *Research in microbiology*, v. 152, n. 8, p. 707-716, 2001.

REGINATTO, T. S. D. C. **Diversidade de bactérias associadas a bromélias do Parque Estadual de Itapuã/RS.** Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. **The concept of species for prokaryotes.** *Revisões de microbiologia FEMS*, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

RYAN, R. P. et al. **The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 7, p. 514, 2009.

RYBERG, A.; OLSSON, C.; AHRNÉ, S.; MONSTEIN, H. J. **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.

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.

SAMPAIO, E. V. D. S. B., & DA COSTA, T. **Estoques e Fluxos de Carbono no Semi-Árido Nordeste: Estimativas Preliminares.** *Revista Brasileira de Geografia Física*, v. 4, n. 6, p. 1275-1291, 2012.

SATO, V. S. **Indução da expressão in vivo e caracterização cinética da fosfatase ácida de *Enterobacter sp.* isolada de raízes de orquídeas.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011.

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.

SHARIF, N. M. *et al.* **Rapid Genotyping of Canine Faecal *Lactobacillus* species by (GTG) 5 Repetitive Element PCR.** *Journal of Livestock Research*, v. 7, p. 190-195, 2017.

SILVA, M. S. **Identificação de actinobactérias em solos de cerrado mineiro durante estação de baixa pluviosidade.** 100 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SILVA, A. F. **Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas nativas de áreas com diferentes tempos de regeneração da caatinga.** 99 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2015.

SILVEIRA, A. B. D. **Isolamento e caracterização de linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul.** 2008. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SILVEIRA, E. L. **Identificação de comunidades bacterianas de solo Por seqüenciamento do gene 16S rRNA.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia)–Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

SOARES, F. L., MELO, I. S., DIAS, A. C. F., & ANDREOTE, F. D. **Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 5, p. 2195-2203, 2012.

SOUSA, S. M. S. C. **Relação entre vegetação, relevo, fertilidade do solo e matéria orgânica em bacia hidrográfica de região semi-árida.** Dissertação. (Mestrado em Manejo de Solo e Água) - Universidade Federal da Paraíba. CCA/UFPB, Areia, 2006.

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.

SPECIAN, V. *et al.* **Molecular phylogeny and biotechnological potential of bacterial endophytes associated with *Malpighia emarginata*.** *Genetics and molecular research: GMR*, v. 15, n. 2, 2016.

SVEC, P., PANTUCEK, R., PETRÁS, P., SEDLÁČEK, I., & NOVÁKOVÁ, D. **Identification of *Staphylococcus spp.* using (GTG) 5-PCR fingerprinting.** *Systematic and applied microbiology*, v. 33, n. 8, p. 451-456, 2010.

TAKETANI, R. G. *et al.* **Functional congruence of rhizosphere microbial communities associated to leguminous tree from Brazilian semiarid region.** Environmental Microbiology reports, v. 7, n. 1, p. 95-101, 2015.

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.

TARAZI, M. F. D. A. **Comunidade bacteriana endofítica em microplantas de abacaxizeiro: estrutura, diversidade e sua influência na morfofisiologia após antibioticoterapia.** Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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, 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.

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.

THUMAR, J. T.; DHULIA, K.; SINGH, S. P. **Isolation and partial purification of an antimicrobial agent from halotolerant alkaliphilic *Streptomyces aburaviensis* strain Kut-8.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 26, n. 11, p. 2081-2087, 2010.

TICKNOR, L. O. *et al.* **Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates.** Applied and environmental microbiology, v. 67, n. 10, p. 4863-4873, 2001.

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.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia** - 12ª Edição, Editora Artmed. Porto Alegre, 2016.

VAN HORN, D. J. *et al.* **Factors controlling soil microbial biomass and bacterial diversity and community composition in a cold desert ecosystem: role of geographic scale.** PLoS One, v. 8, n. 6, p. e66103, 2013.

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.; 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.

YOON, J. H., *et al.* ***Paenibacillus alkaliterrae* sp. nov., isolated from an alkaline soil in Korea.** International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 55, n. 6, p. 2339-2344, 2005.