



**MARTÍN SEBASTIÁN MARCIAL COBA**

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS  
DO SOLO DO CERRADO BRASILEIRO**

**LAVRAS - MG**

**2012**

**MARTÍN SEBASTIÁN MARCIAL COBA**

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS DO SOLO DO  
CERRADO BRASILEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Ecologia, Genética e Fisiologia de microrganismos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

Coorientadores

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

Dr. Disney Ribeiro Dias

**LAVRAS - MG**

**2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Marcial Coba, Martín Sebastián.

Diversidade de bactérias cultiváveis do solo do Cerrado brasileiro / Martín Sebastián Marcial Coba. – Lavras : UFLA, 2011.  
86 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.  
Orientador: Rosane Freitas Schwan.  
Bibliografia.

1. Bacteriologia do solo. 2. Caracterização. 3. Diversidade bacteriana. 4. Populações bacterianas. 5. Estrutura. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.90981

**MARTÍN SEBASTIÁN MARCIAL COBA**

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS DO SOLO DO  
CERRADO BRASILEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Ecologia, Genética e Fisiologia de microrganismos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de dezembro de 2011.

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista	UFLA
Dra. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada	UEM
Dr. Whasley F. Duarte	UFLA

Dra. Rosane Freitas Schwan  
Orientadora

Dr. Disney Ribeiro Dias  
Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista  
Coorientadores

**LAVRAS – MG**

**2011**

*Aos meus pais, que constituem o escudo e a fortaleza do meu espírito.*

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos mediante o Programa Estudante Convênio Pós-Graduação (PEC-PG).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento do projeto BIOTA MINAS.

À professora Rosane Freitas Schwan, pela orientação e pelos ensinamentos passados.

Ao professores Disney Ribeiro Dias e à professora Cristina Ferreira Silva e Batista, pelos conhecimentos transmitidos, motivação e paciência.

Aos professores Cristina Ferreira Silva e Batista, Disney Ribeiro Dias e Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada, pela participação na banca examinadora

À Doutora Karina Teixeira Magalhães, pelo acompanhamento na execução de parte deste projeto.

À técnica Ivani Gervasio, pela contribuição na execução das análises.

## RESUMO

O Cerrado é um bioma de grande extensão, constituindo um corredor para as espécies dos biomas vizinhos e, além disso, é um regulador de energia e intercâmbio de carbono com a atmosfera. A diversidade bacteriana do solo do Cerrado mineiro foi avaliada utilizando-se técnicas dependentes de cultivo por apresentar respostas distintas às geradas por técnicas independentes de cultivo frente às mudanças ambientais que afetam o estado fisiológico dos microrganismos. Para este estudo, foram coletadas cinco amostras compostas de solo nas regiões de Passos, Arcos e Luminárias, durante as estações chuvosa e seca. A partir destas amostras, foi feito o isolamento dos distintos morfotipos utilizando-se os meios ágar nutriente, *eosin methylene blue* (EMB), *yeast extract peptone glucose* (YEPG) e ágar nutriente (pH 4,5). Os isolados foram agrupados, inicialmente, com base na caracterização morfológica e bioquímica e assim selecionados para caracterizarem-se mediante REP-PCR e, finalmente, identificados mediante sequenciamento do gene 16S rRNA. Dessa forma, foram identificados 13 gêneros bacterianos e distintas espécies pertencentes a eles e determinou-se a presença de 39 OTUs na temporada chuvosa e 30 na seca. Com esses dados calcularam-se a riqueza (S), que oscilou entre 5 e 12 na estação chuvosa e 4 e 9 na estação seca, e os índices de Shannon, ( $H'$ ), Simpson (D), de uniformidade de Shannon ( $J'$ ) e recíproco de Simpson ( $1/D$ ). O ponto B de Arcos estação úmida, com teor de alumínio no solo ( $1,0 \text{ mg/dm}^3$ ), foi o mais diverso ( $H'=0,88$ ). O ponto D na estação úmida dessa mesma região registrou o maior teor de alumínio e, dentre todas as amostras, registrou o maior valor do índice de Simpson. Com base nesses resultados foi possível evidenciar mudanças na diversidade de bactérias cultiváveis mediante os indicadores ecológicos utilizados nas três regiões de estudo, em função das condições sazonais.

Palavras-chave: Cerrado. Bactérias cultiváveis. Diversidade Bacteriana. Solo.

## ABSTRACT

The Cerrado is a bioma of great extent for constituting an outlet for the species of the neighboring biomas and, in addition to being a regulator of energy and Carbon interchange with the atmosphere. The bacterial diversity of the soil in the Minas Gerais Cerrado was evaluated by making use of culture dependent techniques for presenting responses distinct from those generated by culture independent techniques before the environmental changes which affect the physiological status of microorganisms. For this study, 5 compound soil samples were collected in the regions of Passos, Arcos and Luminárias during the rainy and dry seasons. From these samples, the distinct morphotypes were isolated using the media Nutrient Agar, EMB, YEPG, Nutrient Agar pH 4,5. The isolates were grouped together at first on the basis of the morphological and biochemical characterization and then selected to characterize themselves by REP-PCR. Finally, identified by sequencing of 16S rRNA gene. In this way, 13 bacterial genera and distinct species belonging to them were identified and the presence of 39 OTUs in the rainy season and 30 in the dry one were identified. Through these data, the richness (S) which oscillated between 5 and 12 in the rainy season and 4 and 9 in the dry season, Shannon index ( $H'$ ), Simpson's index (D), Shannon uniformity index ( $J'$ ) and Simpson's reciprocal index ( $1/D$ ). The B point of Arcos, during the rainy season with a high content of aluminum in soil ( $1,0 \text{ mg/dm}^3$ ) was the most diverse ( $H'=0,88$ ), the point D in the rainy season of the same region which recorded the highest aluminum content among all the samples showed the highest value of the Simpson's index. On the basis of those results, it was possible to evidence changes in the diversity of bacteria through the ecological indicators utilized in the 3 studied regions in function of the seasonal conditions.

Keywords: Cerrado. Culturable bacteria. Bacterial diversity. Soil.



## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 Localização geográfica do Cerrado na América do sul.....	12
---	----

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	10
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>Descrição geral do Cerrado como bioma</b> .....	12
<b>2.2</b>	<b>O solo como habitat</b> .....	14
<b>2.3</b>	<b>Funções bacterianas no solo</b> .....	17
<b>2.3.1</b>	<b>Ciclagem de nutrientes</b> .....	17
<b>2.3.2</b>	<b>Promoção do crescimento vegetal e biocontrole</b> .....	18
<b>2.3.3</b>	<b>Formação de microagregados</b> .....	19
<b>2.3.4</b>	<b>Bactérias fitopatogênicas</b> .....	20
<b>2.4</b>	<b>Estrutura da comunidade bacteriana no solo</b> .....	21
<b>2.4.1</b>	<b>Proteobacteria</b> .....	22
<b>2.4.2</b>	<b>Acidobacteria</b> .....	23
<b>2.4.3</b>	<b>Verrucomicrobia</b> .....	23
<b>2.4.4</b>	<b>Cytophagales</b> .....	24
<b>2.4.5</b>	<b>Actinobacteria</b> .....	24
<b>2.4.6</b>	<b>Firmicutes</b> .....	24
<b>2.4.7</b>	<b>Planctomycetes</b> .....	25
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	26
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGO</b> .....	33
	<b>ARTIGO 1 Diversidade de bactérias cultiváveis do solo do Cerrado brasileiro</b> .....	33

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

O Cerrado Brasileiro, semelhante às savanas africanas, é o segundo maior bioma da América do sul, ocupando entre o 22% e 25% do território do Brasil, correspondendo a uma área aproximada de 2.000.000 km<sup>2</sup>.

Devido à sua localização central no país, constitui um corredor entre os distintos biomas que o rodeiam, formando, dessa maneira, uma interseção entre estas regiões caracterizada por sua estrutura e biodiversidade. A extensão deste bioma representa o hábitat para 160.000 espécies de animais, plantas e fungos. Apresenta clima típico das regiões mais úmidas de savana do mundo, com precipitação anual de 800 a 2.000 mm (em 90% da sua área) e estação fortemente seca durante o inverno do hemisfério sul, aproximadamente entre abril e setembro, enquanto a temperatura média anual oscila entre 18 °C e 28 °C.

Os solos desse bioma têm pH geralmente ácido e com baixa disponibilidade de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, cobre, molibdênio e zinco, e alto conteúdo de alumínio. Por outro lado, o solo é considerado um hábitat complexo e dinâmico para um grande número de organismos. Assim, constitui também um ambiente heterogêneo para o desenvolvimento de microrganismos, sendo estes os responsáveis por 80% a 90% dos processos que ocorrem no solo. Dentre deles, as bactérias constituem parte importante da microbiota, por sua abundância, diversidade de espécies e multiplicidade de suas atividades metabólicas.

A perda da biodiversidade é uma das maiores ameaças nos ecossistemas do mundo no século XXI. Os processos que neles ocorrem são amplamente afetados em função da biodiversidade e devem ser mantidos para permitir a continuidade da existência destes em um ambiente estável ou em constante

mudança. No entanto, mudanças nos processos de um ecossistema podem conduzir a um declínio em sua biodiversidade e, com isso, uma redução em sua funcionalidade, gerando um ciclo de *feedback*.

Considerando que o Cerrado tem sido rapidamente ocupado pelo homem devido ao crescimento das práticas agrícolas, especialmente a pecuária e o cultivo de soja, somente 5,5% da superfície deste bioma estão atualmente protegidos e os estudos indicam que, para o ano 2030, provavelmente estará extinto. Somar estas considerações às condições hostis próprias do lugar é um fator que poderia selecionar espécies com um metabolismo adaptado.

Embora a caracterização da biodiversidade no cerrado esteja progredindo, pouco se conhece sobre os microrganismos bacterianos presentes nele, sendo importante conhecer sua diversidade, sabendo-se que este grupo é responsável por ampla variedade de atividades que têm efeito no funcionamento do ecossistema. Dentre estes microrganismos existem espécies cultiváveis e não cultiváveis. Neste estudo serão consideradas as primeiras, já que, por sua rápida taxa de crescimento, elevada biomassa e atividade metabólica, poderiam apresentar um maior número de variações, em termos de estrutura da comunidade bacteriana frente a mudanças ambientais em curto prazo, como as diferenças climáticas marcadas entre a estação seca e a chuvosa.

Assim, no presente estudo, pretende-se comparar as diferenças entre as populações bacterianas nestas duas estações.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Descrição geral do Cerrado como bioma

O cerrado brasileiro, por sua extensão, é a principal região de savana no continente americano. Seus 2.000.000 de km<sup>2</sup> estão distribuídos desde o limite sul da floresta amazônica até as periferias dos estados de São Paulo e Paraná (Figura 1), desde a zona equatorial até 23° latitude sul, e um intervalo altitudinal desde quase o nível do mar até os 1.800 m (CASTRO et al., 2008).



Figura 1 Localização geográfica do Cerrado na América do sul

Fonte: Oliveira Filho e Ratter (2002)

Por sua localização central no Brasil, o cerrado também é considerado único por sua função como corredor para as espécies dos biomas vizinhos. Assim, por exemplo, 90% das aves do Brasil se reproduzem nesta região (MOTTA; CURI; FRANZMEIER, 2002).

Este bioma é caracterizado por ampla diversidade de vegetação, variando desde densas pastagens usualmente com uma escassa cobertura de arbustos e árvores pequenas, até uma floresta quase fechada, com altura de dossel de 12 até 15 m (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997). As temperaturas médias anuais são de 22 °C, na região sul e 27 °C, no norte, com uma estação seca, com duração de 5 a 6 meses, aproximadamente, entre abril e setembro, e outra chuvosa, com precipitações que oscilam entre os 800 a 2.000 mm (DIAS, 1992).

A maioria dos solos neste bioma é altamente intemperizada com sérias limitações para as culturas, em termos de fertilidade natural do solo. Os solos são ácidos e têm baixa disponibilidade de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, cobre, molibdênio e zinco, mas possuem alta concentração de alumínio (LOPES, 1996).

No estado de Minas Gerais, o Cerrado ocupa aproximadamente 57% do território, o que representa 345.954,4 km<sup>2</sup>, sendo este o estado com o maior número de municípios dentro do Cerrado. Os índices de precipitação estão em torno de 560 mm e 860 mm, no nordeste e 1.160 e 1.460 mm, no Triângulo Mineiro. Na região do Triângulo Mineiro, a distribuição dos solos não obedece a um padrão definido, porém, há o predomínio de Latossolos Vermelhos e Vermelho-Amarelados, geralmente argilosos, em uma topografia plana e levemente ondulada (MOTTA; CURI; FRANZMEIER, 2002). No Triângulo Mineiro e no estado de São Paulo, o Cerrado nativo se encontra reduzido a pequenos remanescentes que raramente excedem a 100 hectares (CALVACANTTI; JOLY, 2002).

Podem-se considerar como fatores determinantes da diversidade deste bioma constituído por 160.000 espécies de plantas, animais e fungos (DIAS, 1992), o clima, o tipo de solo e o fogo. O desencadeamento do fogo é favorecido pelo clima da estação seca; quando a cobertura vegetal é altamente inflamável, este fenómeno recorrente tende a impedir a sucessão vegetal na floresta e também causa empobrecimento do solo (MIRANDA; BUSTAMANTE; MIRANDA, 2002).

## **2.2 O solo como hábitat**

O solo é o resultado da combinação de matéria orgânica e minerais inconsolidados, servindo como hábitat para uma ampla variedade de organismos no qual interagem (ADL, 2003). Dessa maneira, pode-se definir como um sistema complexo, dinâmico e vivo (ZHANG; XU, 2008), que é composto por uma variedade de micro-habitats com distintos gradientes físico-químicos e condições ambientais descontínuas. Os microrganismos adaptam-se a estes micro-habitats e formam consórcios com limites mais ou menos acentuados, interagindo entre si e com outras partes da biota do solo (TORSVIK; ØVREÅS, 2002). Portanto, o solo representa um ambiente altamente heterogêneo e complexo para a microbiota que nele habita (GARBEVA; VEEN; ELSAS, 2004), sendo a complexidade deste sistema definida pelas diversas e numerosas interações entre os componentes físicos, químicos e biológicos que são modulados pelas condições ambientais prevalentes (BUSCOT, 2005).

Os organismos residentes no solo estão expostos a condições abióticas e nutricionais que podem variar até na escala micrométrica. Poderia supor-se que cada micro-hábitat seja ocupado por organismos que foram os mais capazes de colonizar o nicho e se estabeleceram. Dentro destes, os microrganismos de forma coletiva são os principais catalisadores subjacentes dos processos

biogeoquímicos e constituem a maior parte da biomassa no solo (SCHIMEL, 2001). Assim, os processos microbianos, incluindo aqueles que resultam em supressão de doenças vegetais, claramente têm lugar na escala de micro-habitats e de biosferas organismais. Estes processos são suscetíveis a grandes mudanças no entorno, por meio do qual um efeito mensurável será o resultado de mudanças individuais na escala micrométrica (GARBEVA; VEEN; ELSAS, 2004).

As bactérias são o grupo mais abundante de microrganismos e podem atingir concentrações superiores a  $10^8$  UFC/g de solo (SYLVIA et al., 1998) ou  $10^{11}$  UFC/g de material orgânico (BÅÅTH, 1998).

A estrutura do solo delinea os micro-habitats bacterianos e as bactérias se distribuem sob um padrão de recheio localizando-se nos poros abertos das partículas presentes ou incorporadas em polímeros perto de fontes nutricionais. Isso permite concluir que o solo é composto por numerosas e pequenas comunidades microbianas, cada uma delas circunscrita por seu ambiente imediato ou micro-habitat (GRUNDMANN, 2004).

Uma ampla faixa de fatores controla a estrutura e a diversidade das comunidades microbianas no solo. A disponibilidade de fontes de carbono principalmente, junto com fósforo e nitrogênio, é considerada limitante, o que gera competição entre as populações (BALSER; KINZIG; FIRESTONE, 2001). Por exemplo, as raízes das plantas liberam uma variedade de compostos no entorno, incluindo etileno, carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, polissacarídeos e enzimas. Estes materiais criam um ambiente único para os microrganismos que habitam na rizosfera e geram diferentes respostas frente aos exsudados radicais que delinearão distintas comunidades bacterianas que também são influenciadas pelo genótipo e a idade da planta e a zona da raiz (GARBEVA; VEEN; ELSAS, 2004).



Existem fatores ambientais, como temperatura, pH, atividade de água e salinidade, que são conhecidos como moduladores e que diferem dos limitantes (fontes nutricionais); os microrganismos competem pelo segundo (BALSER; KINZIG; FIRESTONE, 2001).

O tipo de solo, caracterizado por fatores moduladores e limitantes, também influencia a estrutura das comunidades microbianas, em função do tamanho de partículas, do pH, da capacidade de intercâmbio de íons e do conteúdo de matéria orgânica (FLERER; JACKSON, 2006; GELSOMINO et al., 1999; GROFFMAN et al., 1996). Estas propriedades podem afetar a estrutura da comunidade microbiana de forma direta, fornecendo um hábitat específico que seleciona microrganismos, ou indiretamente, influenciando o funcionamento e a exsudação da raiz das plantas presentes no lugar (NANNIPIERI et al., 2003).

A textura do solo também pode afetar a microbiota, limitando a disponibilidade dos exsudados da raiz e moléculas de importância biológica, como proteínas e ácidos nucleicos, devido à capacidade da fase sólida de adsorvê-las. As superfícies dos componentes minerais do solo podem catalisar determinadas reações por si mesmas. Por exemplo, minerais da argila e óxidos de manganês (III e IV) e ferro (III) catalisam reações de transferência de elétrons assim como oxidação de fenóis e polifenóis (NANNIPIERI et al., 2003).

Alguns estudos (OMAY et al., 1997; SCHMALENBERGER; TEBBE, 2002; SCHONFELD et al., 2002; SPARLING et al., 1994) indicaram que as práticas agrícolas, como a rotação de culturas, o uso de fertilizantes, a compostagem e a aplicação de pesticidas e herbicidas, também estão vinculadas com a estrutura da comunidade microbiana.

Dessa maneira, as características químicas, físicas e biológicas diferem em tempo e em espaço. As escalas dos habitats dependem, principalmente, do

tamanho do organismo, com alguns micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) para as bactérias e menos de 100  $\mu\text{m}$  para fungos filamentosos.

### **2.3 Funções bacterianas no solo**

A diversidade bacteriana é crítica para o funcionamento do ecossistema, já que é responsável por uma variedade de processos, como a decomposição e a ciclagem de nutrientes, a agregação do solo, a promoção de crescimento vegetal e a patogenicidade (BUSCOT, 2005).

#### **2.3.1 Ciclagem de nutrientes**

Como decompositores primários, as bactérias ocupam posição crítica na rede alimentar do solo, sendo que de 90% a 95% de todos os nutrientes passam através deste grupo de microrganismos para níveis tróficos mais elevados, constituindo, dessa forma, uma fonte dinâmica de nutrientes. Assim, a função e a possível diversidade serão grandes fatores na determinação do funcionamento de um sistema (KENNEDY, 1999).

A maioria de compostos naturais e xenobióticos pode ser quebrada pela atividade metabólica das bactérias do solo. Dessa maneira, complexos compostos orgânicos são convertidos em moléculas menores e mais simples que constituem substratos para outros microrganismos. A matéria orgânica é restituída no solo principalmente a partir de restos vegetais (SEMPLE; REID; FERMOR, 2001).

No ciclo do nitrogênio, algumas espécies bacterianas estão envolvidas na amonificação e em outras transformações. A nitrificação quimioautotrófica é realizada por um número limitado de gêneros, enquanto a nitrificação heterotrófica envolve um grupo maior. A denitrificação está vinculada a uma

variedade de bactérias anaeróbias facultativas e estritas. Outros níveis neste ciclo, como a redução não assimilatória de  $\text{NO}_3$  e  $\text{NO}_2$ , são efetuadas por poucas espécies de gêneros amplamente distribuídos. A bactéria *Rhizobium* sp. forma nódulos na raiz de plantas leguminosas, retira o nitrogênio do ar e o transforma em uma forma assimilável para a planta ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ). A planta permite a formação dos nódulos e fornece fotoassimilados para a bactéria e esta fornece o nitrogênio para a leguminosa (MOFFAT, 1990).

No ciclo do enxofre, somente alguns gêneros sob determinadas condições ambientais são os responsáveis. Assim, a redução de sulfato está ligada a bactérias anaeróbias facultativas ou estritas, enquanto a oxidação do enxofre é realizada por um número limitado de bactérias aeróbicas autotróficas (KENNEDY, 1999).

Cerca de cinquenta espécies de bactérias metanotróficas são responsáveis pela produção do metano. Isto acontece em condições de anaerobiose, enquanto a oxidação é limitada a poucos gêneros aeróbios amplamente distribuídos no solo (KENNEDY, 1999).

### **2.3.2 Promoção do crescimento vegetal e biocontrole**

As bactérias do solo podem afetar o crescimento vegetal de forma direta ou indireta (GLICK, 1995). A capacidade destas bactérias agindo como agentes biocontroladores contra fitopatógenos resulta de uma variedade de mecanismos, como produção de antibióticos, esgotamento de ferro da rizosfera, indução de resistência sistêmica, produção de enzimas líticas da parede celular fúngica e competição por lugares de união na raiz (COMPANT et al., 2005) e assim, indiretamente, estimulam o desenvolvimento da planta. Existem algumas formas em que as bactérias facilitam diretamente o crescimento da planta, como, por exemplo, fixação de nitrogênio; síntese de sideróforos que podem sequestrar o

ferro; síntese de fito-hormônios, como auxinas, citoquininas e giberelinas; solubilização de fosfato e síntese da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase, que diminui os níveis de etileno (GLICK, 2010).

Espécies bacterianas, como *Azospirillum brasiliense* e *Pseudomonas putida*, têm sido relacionadas com o desenvolvimento radicular em distintas plantações, enquanto *Bacillus megaterium* e *Bacillus mucilaginosus* estão vinculadas a uma melhor assimilação nutricional (C, N e P total) da planta (EGAMBERDIYEVA, 2007).

O grupo de microrganismos antagonistas de fitopatogênicos de plantas como *Streptomyces scabies*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia* e *Xanthomonas* (HAAS; DÉFAGO, 2005) é diverso. Neles, as bactérias dos gêneros *Bacillus* (por exemplo, *B. cereus*, *B. pumilis* e *B. subtilis*), *Streptomyces* e *Burkholderia* têm atividade supressiva para vários fitopatógenos. No entanto, o gênero mais estudado pela sua capacidade no controle biológico é *Pseudomonas*, com especial destaque para as espécies *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* (BAREA et al., 2005). As bactérias biocontroladoras utilizam vários mecanismos pelos quais exercem sua atividade, entre eles competição por colonização, competição pelas fontes de carbono e de nitrogênio, produção de sideróforos e produção de antibióticos e de ácido cianídrico, e parasitismo (WHIPPS, 2001).

### **2.3.3 Formação de microagregados**

Os microagregados do solo começam como pequenas partículas de matéria orgânica decadente que se incrusta na mucilagem microbiana e na argila. Durante a decomposição do material orgânico são formadas associações organo-minerais, permitindo a estabilidade estrutural. Esta está relacionada com a concentração de carboidratos presentes no ambiente, o que inclui material celular de plantas, animais e microrganismos, e a mucilagem secretada pelas

raízes, fungos e bactérias. Esta última é formada, principalmente, por polissacarídeos, porém, pode conter ácido poliurônico e vários compostos aminados que usualmente têm carga negativa (BAREA et al., 2005).

Barea et al. (2005) indicam que as pontes de cátions polivalentes entre as partículas de argila e o exopolissacarídeo produzido pelas bactérias formam as principais e mais fortes uniões nos microagregados

Mediante microscopia eletrônica de varredura tem sido demonstrada maior quantidade de células bacterianas ou colônias do que fungos nessas estruturas e as bactérias se apresentam incorporadas em distintas cápsulas de exopolissacarídeo frequentemente rodeadas por uma camada de partículas de argila (BOSSUYT et al., 2001). Aparentemente, essas partículas têm uma função de proteção para as bactérias do estresse ambiental e a encapsulação delas por exopolissacarídeo, junto com a penetração nos poros da argila, faz que as células bacterianas sejam inacessíveis para os outros microrganismos e enzimas. Devido a estas associações, o exopolissacarídeo produzido pelas bactérias é incorporado nos microagregados e contribui para a estabilidade estrutural (CAESAR-TONTHAT et al., 2007).

#### **2.3.4 Bactérias fitopatogênicas**

Espécies de bactérias patógenas de plantas pertencentes aos gêneros *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Ralstonia* causam diferentes doenças e, muitas vezes, com efeitos letais. Todos esses microrganismos colonizam os espaços intercelulares até ocasionar a morte celular. Muitos deles têm especificidade pelo hospedeiro no qual causam a doença por mecanismos dependentes de produção de enzimas hidrolíticas e ou de toxinas, enquanto em plantas não hospedeiras são responsáveis por reações de hipersensibilidade (ALFANO; COLLMER, 1997).

## 2.4 Estrutura da comunidade bacteriana no solo

Devido à importante função das bactérias no solo, sua diversidade tem sido estudada extensamente, mediante métodos independentes de cultivo baseados na amplificação e sequenciamento do 16s rDNA. Estes estudos têm revelado que, no nível de espécies e estirpes, este hábitat é extremamente diverso, com uma riqueza de espécies estimada entre 2.000 e 52.000 (JANSSEN, 2006).

Nenhum dos estudos conseguiu apresentar exatamente a mesma estrutura entre as comunidades bacterianas do solo nas bases de dados (biblioteca de clones) e, raramente, as sequências (16 s rDNA) são idênticas entre as mais comuns e abundantes espécies. No entanto, em níveis taxonômicos mais elevados, o solo exibe uma notável estabilidade na estrutura, em que a maioria dos clones (92%) sempre pertence aos 9 principais filos de bactérias, dos 52 conhecidos, podendo ser cultiváveis e não cultiváveis, que são Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucomicrobia e Gemmatimonadetes (JANSSEN, 2006).

Quirino et al. (2009), mediante sequenciamento do gene 16s rRNA, constataram que a comunidade bacteriana no solo do cerrado *sensu stricto* e espaços transformados em pastagens está conformada por  $\alpha$ -proteobactéria (26,4% e 11,4%), acidobactéria (22,2% e 10%) e actinobactéria (19,4% e 34,3%). Os outros grupos, como  $\beta$ -proteobactéria,  $\gamma$ -proteobactéria,  $\delta$ -proteobactéria, Planctomycetes, Chloroflexi e Verrucomicrobia, representaram entre 1,4% e 8,6%. Por outro lado, Jesus et al. (2009) descreveram que a comunidade bacteriana em solos da Amazônia é constituída por acidobactéria (38,8%), actinobactéria (6,1%), bacteroidetes (8,3%), Chloroflexi (0,3%), Firmicutes (2,4%), Gemmatimonadetes (0,8%) e proteobactéria (36,2%).

Considerando as constantes variações de pH, regimes de uso do solo e vegetação, entre outros fatores, é notável a estabilidade ao nível de filo na estrutura das comunidades bacterianas presentes em distintos solos (YOUSSEF; ELSHAHED, 2009).

#### **2.4.1 Proteobactéria**

É um filo metabolicamente diverso, subdividido em cinco grupos, dos quais quatro,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , são comumente detectados no solo. Segundo Janssen (2006), este filo é o mais abundante nos solos estudados, representando aproximadamente 39% da estrutura das comunidades bacterianas;  $\alpha$ -proteobactéria é, provavelmente, um dos grupos mais abundantes em alguns solos, pode ser estudado por métodos moleculares e dependentes de cultivo, e contém algumas espécies fixadoras de nitrogênio e metilotróficos.

Os membros de  $\beta$  e  $\gamma$ -proteobactéria não são tão abundantes como os de  $\alpha$ , mas também são comumente detectados no solo. São exemplos de  $\beta$  alguns mediadores da nitrificação e de  $\gamma$ , as espécies do gênero *Pseudomonas*. O grupo  $\delta$ -proteobactéria consiste, principalmente, de bactérias redutoras de sulfato e de ferro, embora seja comumente encontrado em solos. Devido à sua intolerância às concentrações atmosféricas de oxigênio, são raramente representados em coleções isoladas sob condições de aerobiose (GUPTA, 2000).

Embora este filo possua a maior quantidade de isolados descritos, a maioria de espécies de proteobactéria do solo não é cultivável (SPAIN; KRUMHOLZ; ELSHAHED, 2009).

### 2.4.2 Acidobactéria

Este grupo bacteriano tem sido detectado em quase todas as amostras de solo analisadas e contém, pelo menos, oito subgrupos filogenéticos, mas alguns autores mencionam até onze (KIELAK et al., 2009), sendo as subdivisões 1, 4 e 6 abundantes no solo. Apesar disso, pouco se conhece sobre estes microrganismos, já que a maioria é não cultivável e somente algumas estirpes têm sido cultivadas no laboratório (ZHANG; XU, 2008). Os membros deste filo ocupam aproximadamente 20% das comunidades bacterianas do solo. Um representante cultivável deste filo é a bactéria *Acidobacterium capsulatum* que, junto com as outras espécies isoladas, demonstrou ser aeróbia heterotrófica. Por este fato se considera que este filo cumpre uma função importante no ciclo do carbono (JANSSEN, 2006).

### 2.4.3 Verrucomicrobia

Representantes deste Filo são comumente detectadas em solos por técnicas moleculares, mas raramente constam em coleções de isolamentos do solo. Atualmente, só poucas estirpes têm sido caracterizadas e, aparentemente, as cepas cultiváveis se especializam na degradação de carboidratos, mas ainda é difícil especular sobre as funções específicas deste gênero. É notável a ampla distribuição e a abundante diversidade destas bactérias no solo (JANSSEN et al., 2002). Este filo representa entre 1% e 10% das comunidades bacterianas presentes nos distintos solos. Um exemplo de espécie pertencente a *Verrucomicrobia* é *Chthoniobacter flavus* (SANGWAN et al., 2005).



#### 2.4.4 Cytophagales

São frequentemente isoladas das amostras de solo e estão envolvidas na degradação aeróbia de celulose e quitina, tendo, portanto, papel importante na degradação da matéria orgânica (ZHANG; XU, 2008).

Este filo é representado por bactérias como *Cytophaga hutchinsonii*, que é um aeróbio com eficiente capacidade de degradar celulose cristalina, assim como papel filtro e algodão. Aparentemente, um contato entre as células e o substrato é requerido para a atividade da celulase (ZHU et al., 2010).

#### 2.4.5 Actinobactéria

São bactérias gram-positivas com alto conteúdo de guanina e citosina e abundantes nas comunidades microbianas do solo. Este grupo de microrganismos pode ser isolado mediante cultivo e é metabolicamente diverso. As bactérias coryneformes e os actinomicetes filamentosos são os mais isolados do solo. É interessante destacar que a detecção desses microrganismos por métodos moleculares é menor do que a partir de métodos dependentes de cultivo, devido à dificuldade de extrair o DNA em função da resistência da parede celular característica desse tipo de bactérias (JANSSEN et al., 2002).

O grupo representa, aproximadamente, 13% da comunidade bacteriana presente no solo e possui gêneros como *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*, *Streptomyces* e *Rubrobacter*, entre outros (JANSSEN, 2006).

#### 2.4.6 Firmicutes

São bactérias gram-positivas com baixo conteúdo de guanina e citosina, cultiváveis e metabolicamente diversas. Este grupo contém os bacilos

formadores de endósporos, os cocos gram-positivos e as bactérias ácido-láticas (AHMAD; SELVAPANDIYAN; BHATNAGAR, 2000).

Dentro deste filo destaca-se o gênero *Bacillus*, que é um dos mais importantes produtores de proteases extracelulares (DIAS et al., 2008), de ácido indol acético e de bacteriocinas (DIAS et al., 2009), e o gênero *Clostridium*, por sua capacidade de fixar nitrogênio no solo (KNIGHT; HARDY, 1966).

Este filo constitui apenas 2% dos clones das bases de dados obtidas a partir de amostras de solos, o que pode explicar-se pela dificuldade de extrair o DNA dos esporos (JANSSEN, 2006).

#### **2.4.7 Planctomycetes**

São organismos aeróbicos que crescem bem em meios de cultura diluídos. Estes organismos se multiplicam por brotamento e não possuem peptidoglicano na parede celular. Poucos representantes deste filo têm sido obtidos a partir de amostras de solo, destacando-se os gêneros *Pirellula*, *Gemmata*, *Isosphaera* e *Planctomyces* (GRIEPENBURG et al., 1999). Algumas das espécies deste filo são responsáveis por uma fração do ciclo do nitrogênio mediante a oxidação anaeróbia da amônia (FUERST; SAGULENKO, 2011). Embora abundantes, o conhecimento da influência ecológica e dos fatores ambientais que influenciam sua diversidade e riqueza nos solos ainda é escasso (BUCKLEY et al., 2006).

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cerrado brasileiro é um bioma de grande importância na América do Sul, não só pela grande extensão de território ocupada, mas também por constituir um corredor entre os biomas que o rodeiam e pela ampla diversidade de espécies que nele habitam. Essa diversidade é determinada por fatores como o clima, o tipo de solo e o fogo. A ocupação crescente de áreas preservadas de cerrado constitui uma ameaça para sua biodiversidade, somando-se este problema a pouco desenvolvida caracterização da microbiota do solo do cerrado.

Os microrganismos e, dentre estes, as bactérias, são responsáveis, em grande parte, pelos processos biogeoquímicos que têm ocorrência no ambiente do solo e que são essenciais para o funcionamento do ecossistema.

É, portanto, importante conhecer a diversidade bacteriana desse bioma e, neste caso, das bactérias cultiváveis que, por sua rápida taxa de crescimento, elevada biomassa e atividade metabólica, permitiriam o entendimento de mudanças em curto prazo na estrutura da comunidade, o que poderia ser proposto para a conservação do Cerrado.

## REFERÊNCIAS

- ADL, S. M. **The ecology of soil decomposition**. Wallingford: CABI, 2003. 335 p.
- AHMAD, S.; SELVAPANDIYAN, A.; BHATNAGAR, R. K. Phylogenetic analysis of Gram-positive bacteria based on *grpE*, encoded by the *dnaK* operon. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, n. 5, p. 1761-1766, Sept. 2000.
- ALFANO, J. R.; COLLMER, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, avr proteins and death. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, n. 18, p. 5655-5662, Sept. 1997.
- BÅÅTH, E. Growth rates of bacterial communities in soils at varying pH: a comparison of the thymidine and leucine incorporation techniques. **Microbial Ecology**, Dordrecht, v. 36, n. 3, p. 316-327, Nov. 1998.
- BALSER, T. C.; KINZIG, A. P.; FIRESTONE, M. K. Linking soil microbial communities and ecosystem functioning. In: KINZIG, A. P.; PACALA, S. W.; TILMAN, D. (Ed.). **The functional consequences of biodiversity: empirical progress and theoretical extensions**. Princeton: Princeton University, 2001. p. 265-270.
- BAREA, J. M. et al. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 417, p. 1771-1778, July 2005.
- BOSSUYT, H. et al. Influence of microbial populations and residues quality on aggregate stability. **Applied Soil Ecology**, Frankfurt, v. 16, n. 3, p. 195-208, Mar. 2001.
- BUCKLEY, D. H. et al. Diversity of planctomycets in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 7, p. 4522-4531, July 2006.
- BUSCOT, F. What are soils? In: BUSCOT, F.; VARMA, S. (Ed.). **Microorganisms in soils: roles in genesis and functions**. Berlin: Springer-Verlag, 2005. p. 3-18.

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**, Frankfurt, v. 36, n. 1, p. 10-21, May 2007.

CALVACANTTI, R. B.; JOLY, C. A. Biodiversity and conservation priorities in the Cerrado region. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Ed.). **The Cerrados of Brazil ecology and natural history of a Neotropical Savanna**. New York: Columbia University, 2002. p. 351-368.

CASTRO, A. P. et al. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archives of Microbiology**, Dordrecht, v. 190, n. 2, p. 129-139, Aug. 2008.

COMPANT, F. et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, Sept. 2005.

DIAS, A. C. F. et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 189-195, Feb. 2009.

DIAS, B. F. S. Cerrados: uma caracterização. In: DIAS, B. F. S. (Ed.). **Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis**. Brasília: FUNATURA, 1992. p. 7-26.

DIAS, D. R. et al. Alkaline protease from *Bacillus sp.* isolated from coffee bean grown on cheese whey. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 24, n. 10, p. 2027-2034, Oct. 2008.

EGAMBERDIYEVA, D. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. **Applied Soil Ecology**, Frankfurt, v. 36, n. 2/3, p. 184-189, June 2007.

FLERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 3, p. 626-631, Jan. 2006.

FUERST, J. A.; SAGULENKO, E. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, n. 6, p. 403-413, June 2011.

GARBEVA, P.; VEEN, J. A. van; ELSAS, J. D. van. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 243-270, Sept. 2004.

GELSOMINO, A. et al. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Frankfurt, v. 38, n. 1/2, p. 1-15, Oct. 1999.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, n. 2, p. 109-117, Feb. 1995.

\_\_\_\_\_. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. **Biotechnology Advances**, Frankfurt, v. 28, n. 3, p. 367-374, May/June 2010.

GRIEPENBURG, U. et al. Phylogenetic diversity, polyamine pattern and DNA base composition of members of the order *Planctomycetales*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 49, n. 2, p. 689-696, Apr. 1999.

GROFFMAN, P. M. et al. Variation in microbial biomass and activity in four different wetland types. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 60, n. 2, p. 622-629, May/Apr. 1996.

GRUNDMANN, G. L. Spatial scales of soil bacterial diversity: the size of a clone. **FEMS Microbiology Ecology**, Hoboken, v. 48, n. 2, p. 119-127, May 2004.

GUPTA, R. S. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, Hoboken, v. 24, n. 4, p. 367-402, Oct. 2000.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 4, p. 307-319, Apr. 2005.

JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial in libraries of 16s rRNA and 16s rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 3, p. 1719-1718, 2006.

JANSSEN, P. H. et al. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2391-2396, 2002.

JESUS, E. D. C. et al. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, London, v. 3, n. 9, p. 1004 -1011, May 2009.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Frankfurt, v. 74, n. 1/3, p. 65-76, June 1999.

KIELAK, A. et al. Phylogenetic analysis of Acidobacteria in a former agricultural soils. **The ISME Journal**, London, v. 3, n. 3, p. 378-382, Mar. 2009.

KNIGHT, E.; HARDY, R. W. F. Isolation and characteristics of flavodoxin from Nitrogen-fixing *Clostridium pasteurianum*. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 241, n. 12, p. 2752-2756, 1966.

LOPES, A. S. Soils under Cerrado: a success story in management. **Better Crops International**, Norcross, v. 10, n. 2, p. 9-15, Nov. 1996.

MIRANDA, M. S.; BUSTAMANTE, M. M. C.; MIRANDA, A. C. The fire factor. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Ed.). **The Cerrados of Brazil ecology and natural history of a Neotropical Savanna**. New York: Columbia University, 2002. p. 51-68.

MOFFAT, A. Nitrogen-fixing bacteria find new partners. **Science**, Washington, v. 250, n. 4983, p. 910-912, Nov. 1990.

MOTTA, P. E. F.; CURI, N.; FRANZMEIER, D. P. Relation of soils and geomorphic surfaces in the Brazilian Cerrado. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Ed.). **The Cerrados of Brazil ecology and natural history of a Neotropical Savanna**. New York: Columbia University, 2002. p. 13-32.

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

OLIVEIRA FILHO, A. R.; RATTER, J. A. Vegetation Physiognomies and woody flora of the Cerrado Biome. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Ed.). **The Cerrados of Brazil ecology and natural history of a Neotropical Savanna**. New York: Columbia University, 2002. p. 91-120.

OMAY, A. B. et al. Changes in soil microbial and chemical properties under long-term crop rotation and fertilization. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 61, n. 6, p. 1672-1678, Nov./Dec. 1997.

QUIRINO, B. F. et al. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiological Research**, Frankfurt, v. 164, n. 1, p. 59-70, Jan. 2009.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, Oxford, v. 80, n. 3, p. 223-230, Sept. 1997.

SANGWAN, P. et al. Detection and cultivation of soil verrucomicrobia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 8402-8410, Dec. 2005.

SCHIMMEL, J. P. Biogeochemical models: implicit vs. explicit microbiology. In: SCHULZE, E. D. et al. (Ed.). **Global biogeochemical cycles in the climate system**. London: Academic, 2001. p. 177-183.

SCHMALENBERGER, A.; TEBBE, C. C. Bacterial community composition in the rhizosphere of transgenic, herbicide resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar *Bosphore*. **FEMS Microbiology Ecology**, Hoboken, v. 40, n. 1, p. 29-37, Apr. 2002.

SCHONFELD, J. et al. Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Hoboken, v. 43, n. 1, p. 63-74, Feb. 2002.

SEMPLE, K.; REID, B.; FERMOR, T. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. **Environmental Pollution**, Frankfurt, v. 112, n. 2, p. 269-283, Apr. 2001.

SPAIN, A. M.; KRUMHOLZ, L. R.; ELSHAHED, M. S. Abundance, composition, diversity and novelty of soil *Proteobacteria*. **The ISME Journal**, London, v. 3, n. 8, p. 992-1000, Aug. 2009.



SPARLING, G. P. et al. A comparison of soil and microbial carbon, nitrogen and phosphorus contents, and macro-aggregate stability of a soil under native forest and after clearance for pasture and plantation of forest. **Biology and Fertility of Soils**, Dordrecht, v. 17, n. 2, p. 91-100, Feb. 1994.

SYLVIA, D. M. et al. **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey: Prentice Hall, 1998. 640 p.

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

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 1, p. 487-511, Mar. 2001.

YOUSSEF, N. H.; ELSHAHED, M. S. Diversity rankings among bacterial lineages in soil. **The ISME Journal**, London, v. 3, n. 3, p. 305-313, Mar. 2009.

ZHANG, L.; XU, Z. Assessing bacterial diversity in soil. **Journal of Soils Sediments**, Dordrecht, v. 8, n. 6, p. 379-388, June 2008.

ZHU, Y. et al. Cellulose and cellodextrin utilization by the cellulolytic bacterium *Cytophaga hutchisonii*. **Bioresource Technology**, Frankfurt, v. 101, n. 16, p. 6432-6437, Aug. 2010.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGO****ARTIGO 1****DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS DO SOLO DO  
CERRADO BRASILEIRO****(Normas da Revista Microbiological Research – Versão Preliminar)**

<sup>1</sup> Martín S. Marcial Coba, <sup>2</sup> Karina Teixeira Magalhães, <sup>2</sup> Cristina Ferreira Silva e Batista, <sup>3</sup> Disney Ribeiro Dias, <sup>2</sup> Whasley F. Duarte <sup>2</sup> Rosane Freitas Schwan

**Resumo**

A diversidade bacteriana do solo do Cerrado mineiro foi avaliada utilizando-se técnicas dependentes de cultivo, por apresentarem respostas distintas das geradas por técnicas independentes de cultivo frente às mudanças ambientais que afetam o estado fisiológico dos microrganismos. Para este estudo, foram coletadas cinco amostras compostas de solo, nas regiões de Passos, Arcos e Luminárias, MG, durante as estações chuvosa e seca. A partir dessas amostras, foi feito o isolamento dos morfotipos utilizando-se os meios ágar nutriente, *eosin methylene blue* (EMB), *yeast extract peptone glucose* (YEPG) e ágar nutriente (pH 4,5). Os isolados foram agrupados, inicialmente, com base na caracterização morfológica e bioquímica e assim selecionados para caracterizarem-se mediante REP-PCR e, finalmente, identificados mediante sequenciamento do gene 16S rRNA. Dessa forma, foram identificados 13 gêneros bacterianos e distintas espécies pertencentes a eles e determinou-se a presença de 39 OTUs na temporada chuvosa e 30 na seca. Com esses dados calcularam-se a riqueza (S), que oscilou entre 5 e 12 na estação chuvosa e 4 e 9 na estação seca e os índices de Shannon, (H'), Simpson (D), de uniformidade de Shannon (J') e recíproco de Simpson (1/D). O ponto B de Arcos estação úmida, com teor de alumínio no

---

<sup>1</sup> Mestrando em Microbiologia Agrícola-UFLA, DBI, Caixa Postal 3037 CEP 3720000 Lavras, Minas Gerais, Brasil

<sup>2</sup> UFLA, DBI, Caixa Postal 3037 CEP 3720000 Lavras, Minas Gerais, Brasil

<sup>3</sup> UFLA, DCA, Caixa Postal 3037 CEP 3720000 Lavras, Minas Gerais, Brasil

Autor para correspondência Rosane Freitas Schwan: rschwan@dbi.ufla.br

solo ( $1,0 \text{ mg/dm}^3$ ) foi o mais diverso ( $H'=0,88$ ). O ponto D na estação úmida dessa mesma região, que registrou o maior teor de alumínio dentre todas as amostras, atingiu o maior valor do índice de Simpson. Com base nesses resultados foi possível evidenciar mudanças na diversidade de bactérias cultiváveis mediante os indicadores ecológicos utilizados nas três regiões de estudo, em função das condições sazonais.

#### **Termos para indexação:**

Cerrado, bactérias cultiváveis, diversidade bacteriana, solo.

#### **Introdução**

O Cerrado brasileiro é o segundo maior bioma do Brasil (Ratter et al., 1997) e a principal formação de savana neotropical na América (Bayer et al., 2010), com extensão aproximada de  $2.000.000 \text{ km}^2$  (Motta et al., 2002), distribuídos desde o limite sul da floresta amazônica até as periferias dos estados de São Paulo e Paraná (Castro et al., 2008), correspondendo entre 22% (Ratter et al., 1997) e 25% do território brasileiro (Gomes, 2000). Constitui um corredor para as espécies dos biomas que o rodeiam (Motta et al., 2002), além de ser um importante regulador de energia e intercâmbio de carbono com a atmosfera (Giambelluca et al., 2009), devido à sua capacidade de sequestrar e armazenar carbono em função do seu comportamento sazonal (Ferreira et al., 2003).

Este bioma tem uma estação seca de cinco a seis meses de duração, entre abril e setembro, e uma temporada chuvosa com precipitações que oscilam entre os 800 e  $2.000 \text{ mm}$  (Dias, 1992).

Em Minas Gerais, o Cerrado ocupa aproximadamente 57% do território, o que representa  $345.954,4 \text{ km}^2$ , sendo este o estado com maior número de municípios dentro do bioma. Os índices de precipitação estão em torno de 560 mm e 860 mm, no nordeste e 1.160 e 1.460 mm, no Triângulo Mineiro. Na região do Triângulo Mineiro, a distribuição dos solos não obedece a um padrão

definido, porém, existe predomínio de Latossolos Vermelhos e Vermelho-Amarelos, geralmente argilosos, em uma topografia plana e levemente ondulada (Motta et al., 2002). No Triângulo Mineiro e no estado de São Paulo, o Cerrado nativo se encontra reduzido a pequenos remanescentes que raramente excedem a 100 hectares (Calvacanti e Joly, 2002).

A perda da biodiversidade é uma das maiores ameaças nos ecossistemas do mundo, no século XXI. Os processos que neles ocorrem são amplamente afetados em função da biodiversidade e devem ser mantidos para permitir a continuidade da existência desses ecossistemas em um ambiente estável ou em constante mudança.

A diversidade bacteriana é crítica para o funcionamento do ecossistema, devido à variedade de processos pelos quais são responsáveis as bactérias, com a decomposição e a ciclagem de nutrientes, a agregação do solo e a patogenicidade (Kennedy, 1999).

Considerando que o Cerrado tem sido ocupado rapidamente pelo homem devido ao crescimento das práticas agropecuárias e com tendência a ser extinto no ano 2030 (Bresolin et al., 2010), pouco se conhece da sua diversidade bacteriana (Quirino et al., 2009), embora este grupo seja responsável por ampla variedade de atividades que têm efeito no funcionamento do ecossistema (Buscot, 2005) e, neste caso, no solo, que pode ser considerado um sistema complexo e dinâmico (Zhang e Xu, 2008).

As bactérias cultiváveis, por apresentarem rápida taxa de crescimento e elevada biomassa e atividade metabólica, poderiam apresentar um maior número de variações em termos de estrutura da comunidade frente a mudanças ambientais, como as diferenças marcadas entre as estações climáticas (Edenborn e Sexstone, 2007).

Distintos índices ecológicos são utilizados nos estudos de biodiversidade. Por exemplo, o de Shannon é uma medida da dificuldade em

predizer a identidade do seguinte indivíduo na comunidade, conhecendo previamente a do anterior. Dessa maneira, indica a heterogeneidade da comunidade. Também o índice de Simpson é comumente aplicado e constitui a probabilidade de que dois indivíduos selecionados aleatoriamente na comunidade pertençam à mesma espécie e dizer que quanto maior for o valor do índice menor diversidade existirá em função da dominância de uma ou mais espécies. O índice de uniformidade de Shannon representa o grau de uniformidade com que as espécies são distribuídas dentro da comunidade, enquanto o recíproco de Simpson é uma medida de diversidade, porém, derivado do índice de Simpson.

Com o objetivo de determinar variações na diversidade bacteriana do solo do cerrado brasileiro em ambientes altamente preservados, foram aplicados os índices de Shannon ( $H'$ ), Simpson ( $D$ ), uniformidade de Shannon ( $J'$ ) e recíproco de Simpson ( $1/D$ ) junto à riqueza ( $S$ ) de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) nas comunidades bacterianas constituídas pelos isolados, que foram caracterizados e identificados nas estações chuvosa e seca.

## **Material e métodos**

### **Amostragem**

Um total de trinta amostras compostas foi coletado, durante as estações chuvosa e seca, nos meses de janeiro e agosto, respectivamente, no Cerrado de Minas Gerais, nos municípios de Passos, Arcos e Luminárias, considerados altamente conservados e cuja localização georreferenciada encontra-se na Tabela 1. Cada amostra foi obtida segundo Lima et al. (2008). Doze subamostras de 75 a 100 g foram retiradas de cada ponto, em dois círculos concêntricos com raio de 3 e 6 m do centro e profundidade 0 a 20 cm, utilizando-se um trado flambado. O

material correspondente a cada ponto foi misturado em sacos estéreis e conservado, a 4 °C, até seu estudo.

Tabela 1 Localização geográfica e descrição dos pontos de amostragem no Cerrado brasileiro, em Minas Gerais.

Região		Localização
Passos	Ponto A	20°49'57,7"S; 046°30'29,3"W
	Ponto B	20°49'56,8"S; 046°30'30,1"W
	Ponto C	20°49'48,0"S; 046°30'54,9"W
	Ponto D	20°49'47,1"S; 046°30'54,5"W
	Ponto E	20°49'47,8"S; 046°30'51,5"W
Arcos	Ponto A	21°37'51,0"S; 044°58'22,7"W
	Ponto B	21°37'50,6"S; 044°58'22,7"W
	Ponto C	21°37'51,5"S; 044°59'11,0"W
	Ponto D	21°37'55,3"S; 044°59'29,3"W
	Ponto E	21°37'54,6"S; 044°59'54,0"W
Luminárias	Ponto A	20°16'27,7"S; 045°29'14,6"W
	Ponto B	20°14'47,9"S; 045°25'35,9"W
	Ponto C	20°14'51"S; 045°31'40,8"W
	Ponto D	20°14'48,6"S; 045°31'33,4"W
	Ponto E	20°14'58,0"S; 045°31'54,0"W

### **Análise físico-química do solo do Cerrado mineiro**

Aproximadamente 200 g de cada amostra foram destinados às análises físico-químicas, no laboratório de química do solo, no Departamento de Ciências do Solo da Universidade Federal de Lavras, conforme Embrapa (1997). Foram avaliadas as concentrações de potássio (K), fósforo (P), alumínio (Al), magnésio (Mg) e matéria orgânica (MO), além de pH, hidrogênio + alumínio (H+Al), cálculo de bases intercambiáveis (SB) e textura do solo. O programa SAS

System 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) foi utilizado para análise estatística, com o procedimento do modelo linear geral.

### **Isolamento bacteriano, e purificação de culturas**

Dez gramas de solo de cada amostra composta foram adicionados a 90 mL de água peptonada estéril (peptona bacteriológica 1g/L) e homogeneizados, sob agitação a 130 rpm, durante 10 minutos (diluição  $10^{-1}$ ) e diluídos até  $10^{-8}$ . A partir destas diluições foram inoculados 100  $\mu$ L por espalhamento na superfície de placas de ágar nutriente (extrato de carne 3 g, peptona 5 g, ágar 15g/L água, pH 4,5), EMB (digerido pancreático de gelatina 10 g, lactose 10 g, fosfato dipotássico 2 g, eosina e 0,4 g, azul de metileno 65 mg, ágar 15 g/L de água destilada), YEPG ágar (extrato de levedura 10 g, peptona 20 g, glicose 20 g, ágar 20 g/L de água destilada) e ágar nutriente com nistatina (extrato de carne 3 g, peptona 5 g, nistatina 20 mg, ágar 15 g/L água pH 6,8) e incubadas, a 30 °C, por 24 e 48 horas.

A partir das placas com contagem entre 30-300 UFC/mL, isolou-se a raiz quadrada dos diversos morfotipos coloniais quantificados. Estes foram cultivados em 500  $\mu$ L de caldo nutriente, a 30 °C, por 24 horas, adicionados de glicerol para uma concentração final de 20% e preservados, por congelamento, a -20 °C, em criotubos. Estes isolados foram reativados em ágar nutriente após incubação a 30 °C/24 horas, com o propósito de padronizar a caracterização da morfologia colonial das bactérias (tamanho, forma, elevação, brilho, consistência e cor), que foram isoladas, inicialmente, em distintos meios, tendo, assim, maior possibilidade de uma mesma cepa apresentar variações morfológicas. As culturas consideradas puras foram preservadas em criotubos sob as condições já descritas.

### **Caracterização bioquímica e agrupamento**

As culturas puras dos distintos morfotipos coloniais foram caracterizadas mediante as seguintes provas: coloração de Gram e morfologia microscópica, catalase, esporulação, motilidade e liquefação da gelatina, como descrito por Holt et al. (1994). Os resultados destes testes junto à caracterização morfológica dos diversos isolados foram submetidos à análise de grupos no programa BioDiversity Pro ver.2 (McAleece et al., 1997). As matrizes de similaridade foram geradas utilizando-se a análise de grupos de Bray-Curtis e os dendrogramas criados usando o vínculo simples. Cepas representativas de cada grupo foram submetidas à caracterização molecular.

### **Extração de DNA**

O DNA genômico total foi extraído segundo Pereira et al. (2010): colônias isoladas de culturas puras, com 24 horas de incubação, foram suspendidas em 15 µL de água MiliQ e submetidas a aquecimento, a 95 °C, durante 15 minutos, sem processamento adicional. Esta metodologia antecedeu os ensaios de REP-PCR e PCR do gene 16S rRNA.

### **Caracterização molecular baseada em *repetitive extragenic palindromic-PCR (REP-PCR)***

A caracterização molecular dos isolados selecionados foi realizada mediante a reação em cadeia da polimerase de sequências palindrômicas repetitivas extragênicas (REP-PCR), segundo Gevers et al. (2001). Para isso, 2 µL de DNA foram adicionados a 12,5 µL Taq PCR Master Mix (Qiagen, São Paulo, Brasil); 8 µL de H<sub>2</sub>O; 0,25 µL de BSA; 0,25 µL de formamida e 2 µL do



*primer* GTG 5 (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3'). A PCR foi desenvolvida da seguinte maneira: 5 minutos de desnaturação inicial, a 94 °C; 30 ciclos de 95 °C, por 30 segundos; 45 °C, por 60 segundos e 60 °C, por 5 minutos, seguidos por uma elongação final, a 60 °C, por 16 minutos. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE 1x a 60 V/4 horas, tingidos com SYBR Green (Invitrogen, Foster City, CA, USA) e visualizados em um transiluminador. Os perfis de bandas foram submetidos à análise de grupos no programa Bionumerics 2,50 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

#### **Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA**

Isolados representativos de cada perfil de bandas foram selecionados para a amplificação do gene 16S rRNA, segundo Wang et al. (2006). Para isso, 2 µL de DNA foram adicionados a 30 µL de Taq PCR Master Mix (Qiagen, São Paulo, Brasil); 26 µL de H<sub>2</sub>O, 1 µL de *primer* 27f (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1 µL de *primer* 1512r (5-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3'). A PCR foi desenvolvida com uma desnaturação inicial, a 95 °C, por 10 minutos, seguida de 25 ciclos de 93 °C, por 1 minuto; 50 °C, por 1 minuto; 72 °C, por 1 minuto e 30 segundos e uma elongação final, a 72 °C, durante 5 minutos. A presença de produtos da PCR foi confirmada mediante eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x a 70 V/30 minutos, tingidos com SYBR Green (Invitrogen, Foster City, CA, USA) e visualizados em um transiluminador. O sequenciamento dos amplicons foi realizado na Macrogen (Macrogen, Inc., Seul, Coreia) e as sequências foram comparadas com a base de dados do GenBank, utilizando-se o algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

## Índices de diversidade de espécies

Inicialmente, foi determinada a riqueza de espécies ( $S$ ), representada pelo número de unidades taxonômicas operacionais (OTU) constituídas por cada um dos agrupamentos obtidos na caracterização bioquímica e molecular, os quais foram nomeados segundo o gênero e a espécie de isolados representativos, identificados mediante análise parcial da sequência do gene 16S rRNA, .

A diversidade de espécies foi avaliada utilizando-se o programa BioDiversity Pro ver.2 (McAleece et al., 1997), mediante o cálculo dos seguintes índices: Shannon-Weaver ( $H' = -\sum p_i \ln p_i$ ), em que  $p_i$  representa a proporção de cada OTU dentro da totalidade de indivíduos da comunidade; uniformidade de Shannon ( $J' = \frac{H'}{S}$ ); dominância de Simpson ( $D = \frac{1}{\sum \left[ \frac{n_i(n_i-1)}{N(N-1)} \right]}$ ), em que  $n_i$  representa o número de indivíduos de uma OTU e  $N$ , a totalidade de indivíduos presentes na comunidade, e índice recíproco de Simpson ( $1/D$ ).

A quantificação de indivíduos em cada OTU foi feita de seguinte maneira: o resultado do sequenciamento foi correlacionado com cada perfil de bandas do REP-PCR. Este, por sua vez, foi correlacionado com o grupo de isolados os quais representava e, assim, nos dendrogramas correspondentes a cada ponto de amostragem, conseguiu-se quantificar cada uma das OTUs.

## RESULTADOS

### Características físico-químicas do solo do Cerrado brasileiro

Os resultados da caracterização físico-química das amostras de solos das regiões de Passos, Arcos e Luminárias, nas estações chuvosa e seca, foram, de forma geral, semelhantes (Tabelas 2 e 3.). Não houve diferença estatística

significativa nas concentrações de fósforo, magnésio e matéria orgânica entre as três áreas de estudo. Porém, foi possível observar que os valores de pH oscilaram entre 4,7 e 5,5, em Passos; entre 4,1 e 5,0, em Arcos e entre 5,0 e 5,4, em Luminárias. Além disso, o cerrado na região de Arcos apresentou os maiores valores de alumínio na estação chuvosa e de  $H + Al$  nas duas estações, diferente do que ocorreu na temporada seca, quando em Luminárias foram registrados os maiores valores na concentração de alumínio. As amostras de Passos e Luminárias apresentaram diferentes texturas, diferente de Arcos, onde todos os solos foram argilosos.

Tabela 2 Caracterização físico-química e 1/D das amostras coletadas na estação chuvosa

Região/ ponto	pH	P mg/dm <sup>3</sup>	K mg/dm <sup>3</sup>	Mg mg/dm <sup>3</sup>	Al mg/dm <sup>3</sup>	H+Al C mol/dm <sup>3</sup>	MO dag / Kg	SB mg/dm <sup>3</sup>	Textura
PA A	5,3±0,1a	1,5±0,1a	25±1a	0,1±0,0a	0,6±0,1a	3,6±0,1a	1,4±0,1a	0,3±0,1a	Arenosa
PA B	5,4±0,1a	1,5±0,1a	56±2a	0,1±0,0a	0,6±0,1a	4,5±0,1a	2,0±0,1a	0,4±0,1a	Média
PA C	5,5±0,1a	1,2±0,1a	33±1a	0,2±0,0a	0,4±0,1a	2,6±0,1a	1,1±0,1a	0,3±0,1a	Média
PA D	5,5±0,1a	1,0±0,1a	70±1b	0,1±0,0a	0,5±0,1a	3,6±0,1a	1,5±0,1a	0,5±0,1a	Média
PA E	5,4±0,1a	0,7±0,1a	9±1b	0,1±0,0a	0,1±0,1a	1,7±0,1a	0,4±0,1b	0,2±0,1a	Média
LU A	5,4±0,1a	1,2±0,1a	28±1a	0,2±0,0a	0,5±0,1a	7,9±0,1a	3,4±0,1a	0,3±0,1a	Argilosa
LU B	5,0±0,1a	1,5±0,1a	20±1a	0,1±0,0a	0,5±0,1a	7,9±0,1a	2,6±0,1a	0,3±0,1a	Argilosa
LU C	5,1±0,1a	1,2±0,1a	11±1b	0,2±0,0a	0,3±0,1a	2,6±0,1a	1,1±0,1a	0,2±0,1a	Arenosa
LU D	5,2±0,1a	2,0±0,1a	20±1a	0,1±0,0a	0,9±0,2a	7,0±0,1a	2,4±0,1a	0,3±0,1a	Média
LU E	5,1±0,1a	1,5±0,1a	34±1a	0,1±0,0a	0,8±0,1a	8,8±0,3b	2,7±0,1a	0,3±0,1a	Argilosa
AR A	5,0±0,1a	1,2±0,1a	48±1a	0,1±0,0a	0,6±0,1a	4,0±0,1a	1,6±0,1a	0,7±0,1a	Argilosa
AR B	4,6±0,1a	0,7±0,1a	39±1a	0,1±0,0a	1,0±0,1a	6,3±0,1a	2,0±0,1a	0,3±0,1a	Argilosa
AR C	4,1±0,1a	1,8±0,1a	27±1a	0,3±0,0a	2,1±0,1b	15,3±1b	3,4±0,1a	0,3±0,1a	Argilosa
AR D	4,1±0,1a	1,8±0,1a	33±1a	0,1±0,0a	2,4±0,1b	17,1±2b	4,0±0,1a	0,3±0,1a	Argilosa
AR E	5,0±0,1a	1,8±0,1a	69±2b	0,1±0,0a	1,8±0,1b	12,3±1b	2,7±0,1a	0,4±0,1a	Argilosa

Médias dos valores duplicados; ± desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças significativas (P<0,05). Abreviações: PA - Passos; LU - Luminárias; AR - Arcos; MO - matéria orgânica; SB - soma de bases trocáveis (Ca, Mg, Na e K); 1/D - índice recíproco de Simpson

Tabela 3 Caracterização físico-química e 1/D das amostras coletadas na estação seca

Região/ ponto	pH	P mg/dm <sup>3</sup>	K mg/dm <sup>3</sup>	Mg mg/dm <sup>3</sup>	Al mg/dm <sup>3</sup>	H+Al C mol/dm <sup>3</sup>	MO dag / Kg	SB mg/dm <sup>3</sup>	Textura
PA A	4,7±0,1a	1,7±0,1a	113,8±1b	0,1±0,0a	0,2±0,1a	13,7±0,1b	3,9±0,1a	0,5±0,1a	Arenosa
PA B	5,1±0,1a	1,7±0,1a	88,9±1b	0,1±0,0a	0,4±0,1a	5,6 ±0,1a	2,4±0,1a	0,7±0,1a	Média
PA C	5,1±0,1a	1,4±0,1a	137,28 ±1b	0,1±0,0a	0,4±0,1a	4,5±0,1a	2,2 ±0,1a	0,8±0,1a	Média
PA D	5,1±0,1a	1,7±0,1a	117±1b	0,1±0,0a	0,5±0,1a	5,0±0,1a	1, 9±0,1a	0,9±0,1a	Média
PA E	5,2±0,1a	1,4 ±0,1a	54 ±1b	0,1±0,0a	0,2 ±0,1a	4,5 ±0,1a	1,7 ±0,1a	0,4 ±0,1a	Média
LU A	5,1±0,1a	2,5±0,1a	37,4±1a	0,1±0,0a	0,6±0,1a	6,3±0,1a	2,2±0,1a	0,1±0,1a	Argilosa
LU B	5,1±0,1a	0,9±0,1a	37,4±1a	0,1±0,0a	1,5±0,1b	7,0±0,1a	2,8±0,1a	0,2±0,1a	Argilosa
LU C	5,2±0,1a	0,9±0,1a	39 ±1a	0,1±0,0a	0,7±0,1a	7,8±0,1a	2,8±0,1a	0,2±0,1a	Arenosa
LU D	5,0 ±0,1a	1,2 ±0,1a	46±1a	0,1±0,0a	1,5±0,1b	10,9±0,1b	3,0 ±0,1a	0,3±0,1a	Média
LU E	5,0 ±0,1a	1,2 ±0,1a	67±1b	0,1±0,0a	1,4 ±0,1b	9,88±0,1b	3,1 ±0,1a	0,3±0,1a	Argilosa
AR A	4,7±0,1a	2,0±0,1a	149,7±1b	0,1±0,0a	0,4 ±0,1a	8,7±0,1a	2,4 ±0,1a	1,3 ±0,1a	Argilosa
AR B	4,8±0,1a	1,4±0,1a	48,3±1a	0,6±0,0a	0 ±0,1a	7,0±0,1a	1,8 ±0,1a	0,2 ±0,1a	Argilosa
AR C	4,3±0,1a	1,4±0,1a	54,6±1a	0,1±0,0a	0,1 ±0,1a	15,3±1b	2,8 ±0,1a	0,3±0,1a	Argilosa
AR D	4,2±0,1a	1,7±0,1a	39±1a	0,1±0,0a	0 ±0,1a	17,1±1b	3,0 ±0,1a	0,2 ±0,1a	Argilosa
AR E	4,8±0,1a	1,2±0,1a	84,2±2b	0,1±0,0a	0,1±0,1a	10,9±1b	1,9±0,1a	0,4±0,1a	Argilosa

Médias dos valores duplicados; ± desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças significativas (P<0,05). Abreviações: PA - Passos; LU - Luminárias; AR - Arcos; MO - matéria orgânica; SB - soma de bases trocáveis (Ca, Mg, Na e K); 1/D - índice recíproco de Simpson

### **Isolamento, caracterização e agrupamento**

Para a contagem da população bacteriana total foram utilizadas as placas com ágar nutriente com crescimento entre 30 e 300 UFC/g de solo (Tabela 4), uma vez que não houve crescimento a partir de todas as amostras inoculadas no meio BEM. Os meios YEPG e ágar nutriente com pH 4,5 só foram utilizados para a estação seca, sendo que neste último houve crescimento só a partir da amostra correspondente ao ponto B de Passos. No entanto, isolados dos distintos meios foram considerados no estudo.

Comparando-se a contagem bacteriana total entre as duas estações utilizando o teste t de Student no programa SISVAR 4.5 (Ferreira, 2006), não se observou diferença estatística significativa nas regiões de Passos e Luminárias, enquanto na região de Arcos houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

Tabela 4 Contagem da população bacteriana total, em Log UFC/g de solo, em ágar nutriente, na estação chuvosa e na seca

Região	Estação chuvosa					Estação seca					p	t
	Pontos					Pontos						
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E		
<b>Passos</b>	7,26 ±0,01	5,82 ±0,015	5,98 ±0,023	5,94 ±0,025	5,14 ±0,015	5,67 ±0,01	4,69 ±0,005	7,14 ±0,01	4,86 ±0,005	5,10 ±0,011	0,367	0,227
<b>Arcos</b>	6,19 ±0,005	6,05 ±0,015	6,12 ±0,01	6,13 ±0,005	5,6 ±0,01	5,16 ±0,015	4,86 ±0,01	5,43 ±0,005	4,82 ±0,01	4,77 ±0,015	0,00044	5,724
<b>Luminárias</b>	5,07 ±0,01	6,04 ±0,01	4,96 ±0,005	5,81 ±0,01	5,92 ±0,011	5,01 ±0,015	4,78 ±0,01	5,16 ±0,01	5,26 ±0,01	4,95 ±0,015	0,059	2,196

± desvio padrão; Abreviações: p - valor p obtido na prova t de student; t - valor t obtido na prova t de student

Um total de 672 isolados foi caracterizado como descrito na metodologia, sendo inicialmente classificados mediante dendrogramas correspondentes a cada ponto de amostragem. A partir dos grupos obtidos, foram selecionados isolados, os quais, novamente, foram submetidos à análise de grupos correspondentes a cada região de amostragem (Figura 1 – Figura 6). Exemplos selecionados de cada grupo (188 isolados) foram submetidos à caracterização mediante REP-PCR, quando foram obtidos 149 perfis de bandas distintos (Figura 7).



Bray-Curtis Cluster Analysis (Single Link)

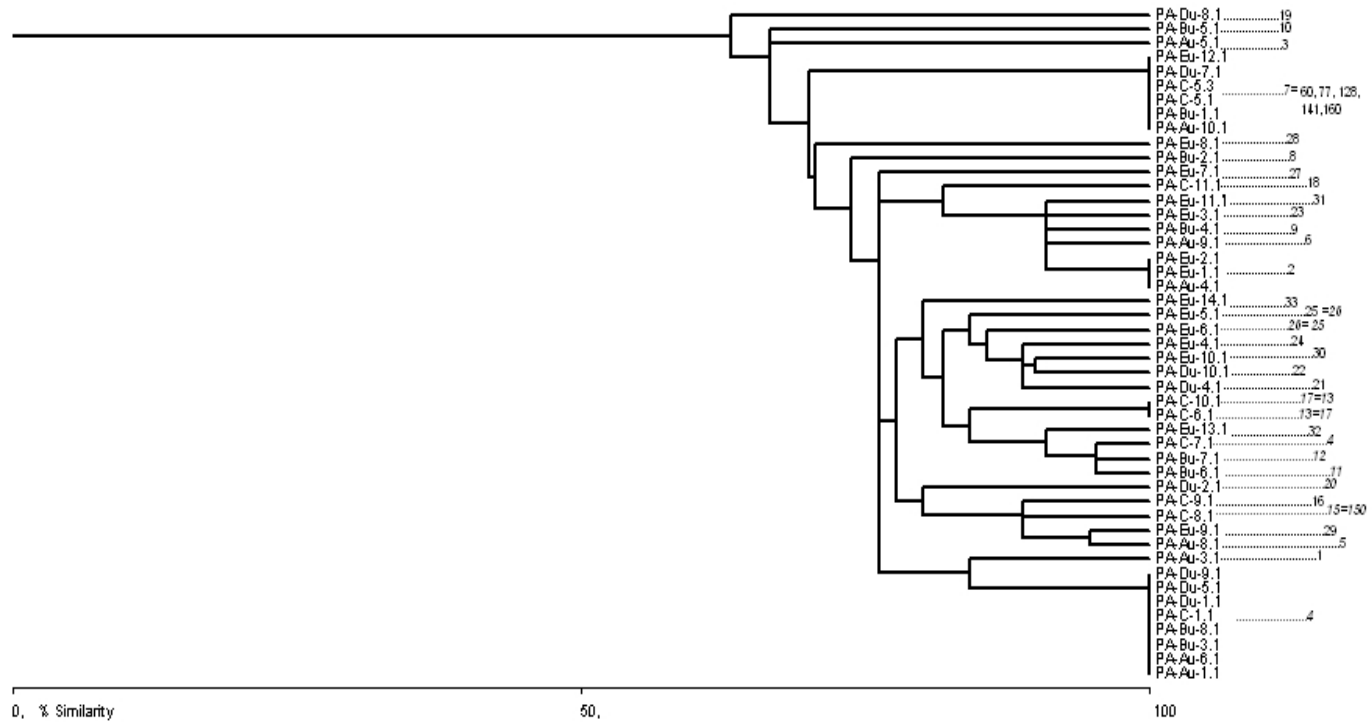


Figura 1 Dendrograma correspondente à região de Passos na estação chuvosa. Código numérico corresponde ao perfil de bandas no REP-PCR. Código alfanumérico corresponde à denominação dos isolados, em que A, B, C, D e E representam os pontos de amostragem

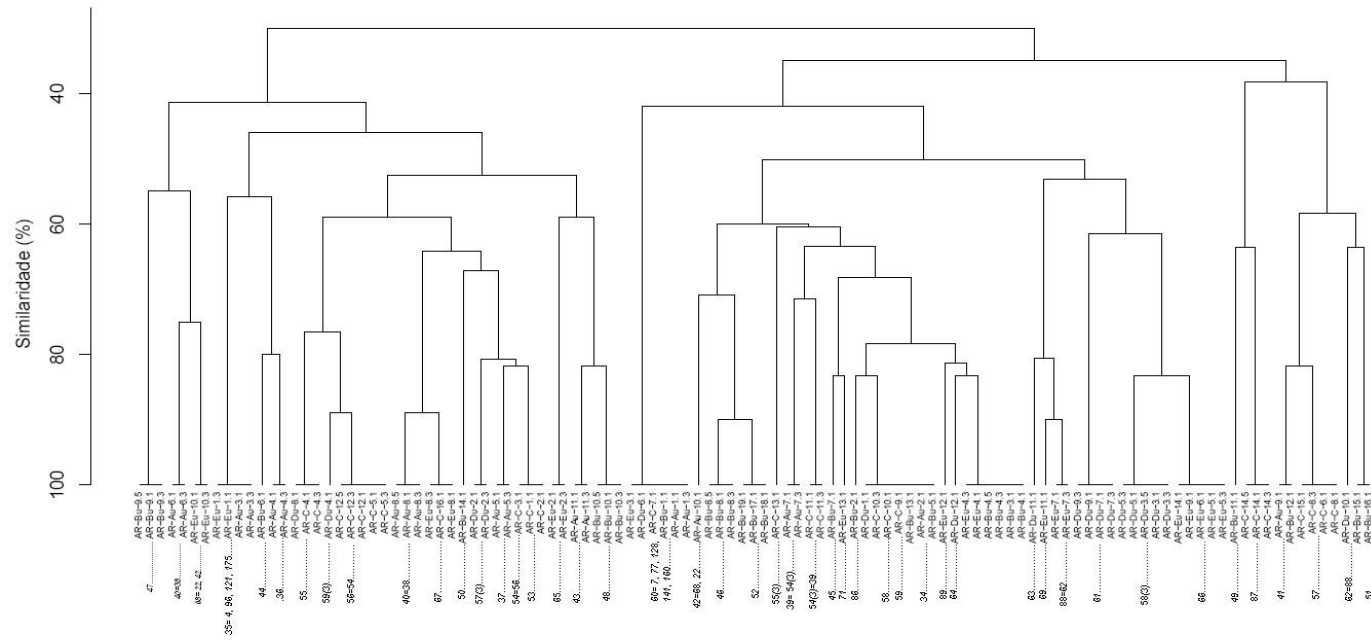


Figura 2 Dendrograma correspondente à região de Arcos na estação chuvosa. Código numérico corresponde ao perfil de bandas no REP-PCR. Código alfanumérico corresponde à denominação dos isolados, em que A, B, C, D e E representam os pontos de amostragem

Bray-Curtis Cluster Analysis (Single Link)

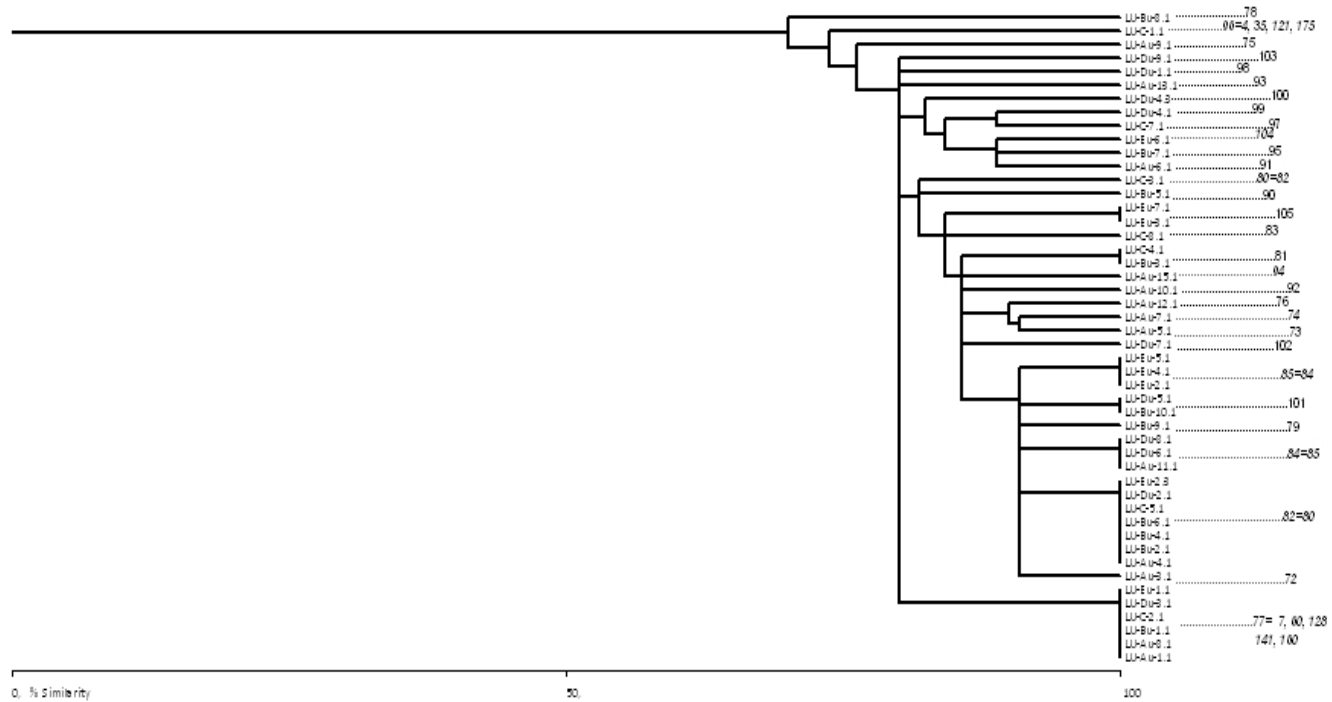


Figura 3 Dendrograma correspondente à região de Luminárias na estação chuvosa. Código numérico corresponde ao perfil de bandas no REP-PCR. Código alfanumérico corresponde à denominação dos isolados, em que A, B, C, D e E representam os pontos de amostragem

Bray-Curtis Cluster Analysis (Single Link)

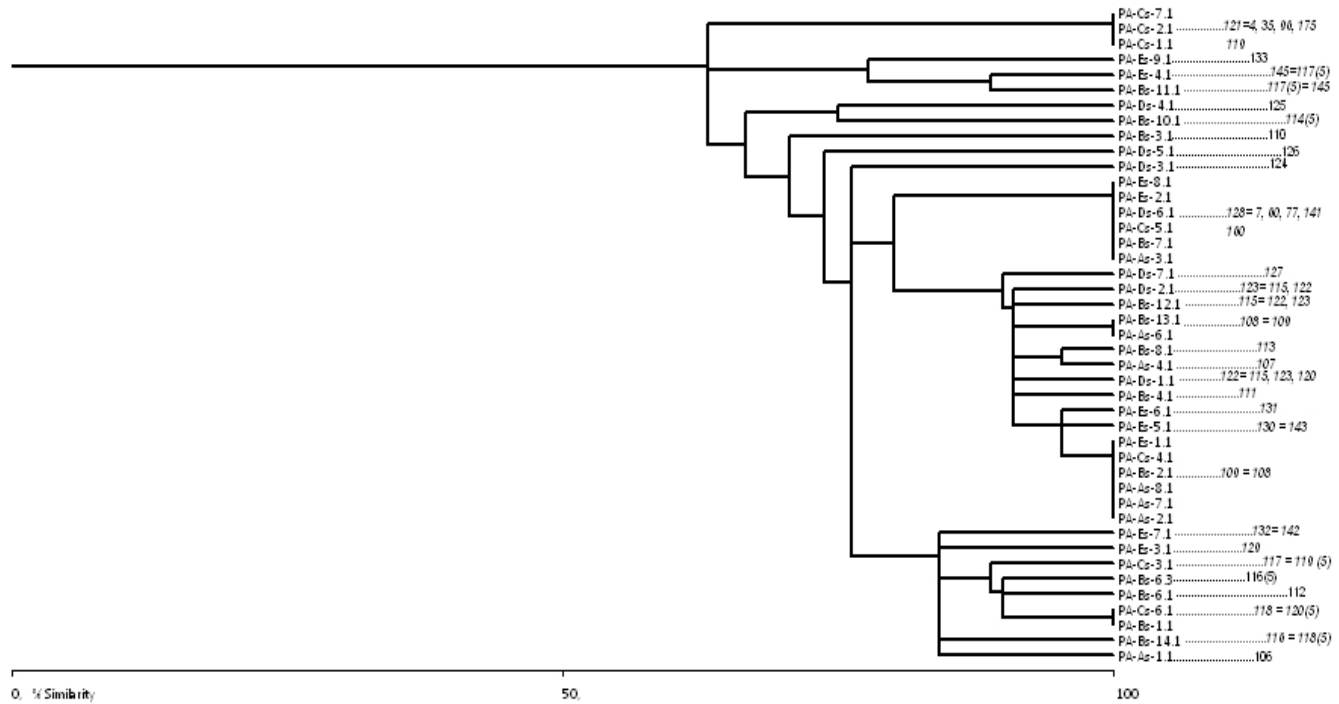


Figura 4 Dendrograma correspondente à região de Passos na estação seca. Código numérico corresponde ao perfil de bandas no REP-PCR. Código alfanumérico corresponde à denominação dos isolados, em que A, B, C, D e E representam os pontos de amostragem

Bray-Curtis Cluster Analysis (Single Link)

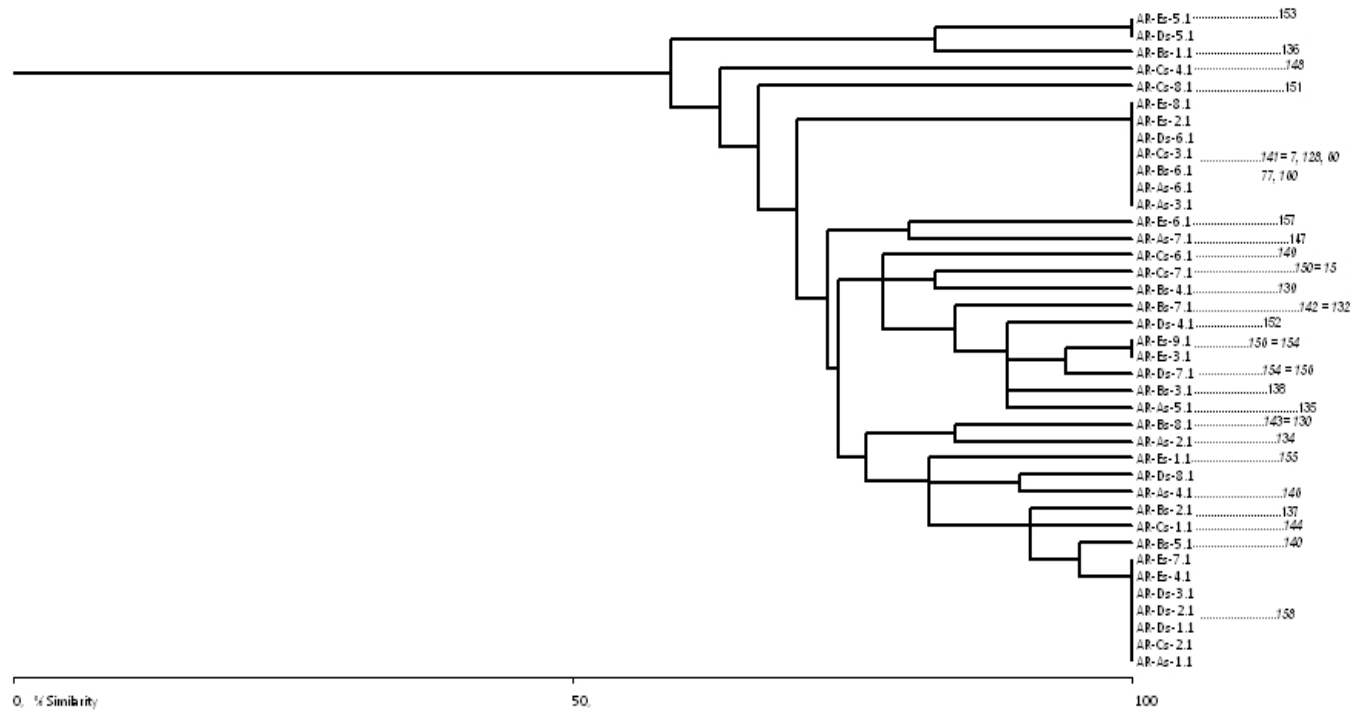


Figura 5 Dendrograma correspondente à região de Arcos na estação seca. Código numérico corresponde ao perfil de bandas no REP-PCR. Código alfanumérico corresponde à denominação dos isolados, em que A, B, C, D e E representam os pontos de amostragem

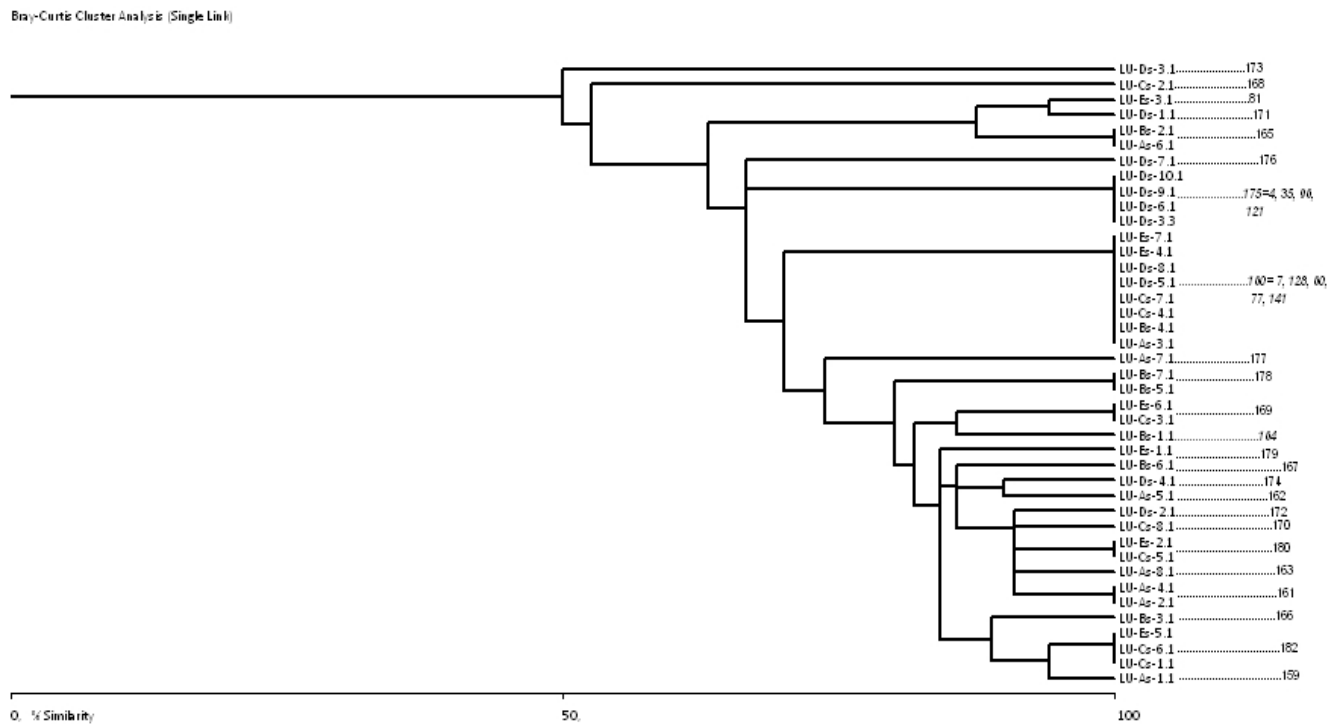


Figura 6 Dendrograma correspondente à região de Arcos na estação seca. Código numérico corresponde ao perfil de bandas no REP-PCR. Código alfanumérico corresponde à denominação dos isolados, em que A, B, C, D e E representam os pontos de amostragem.

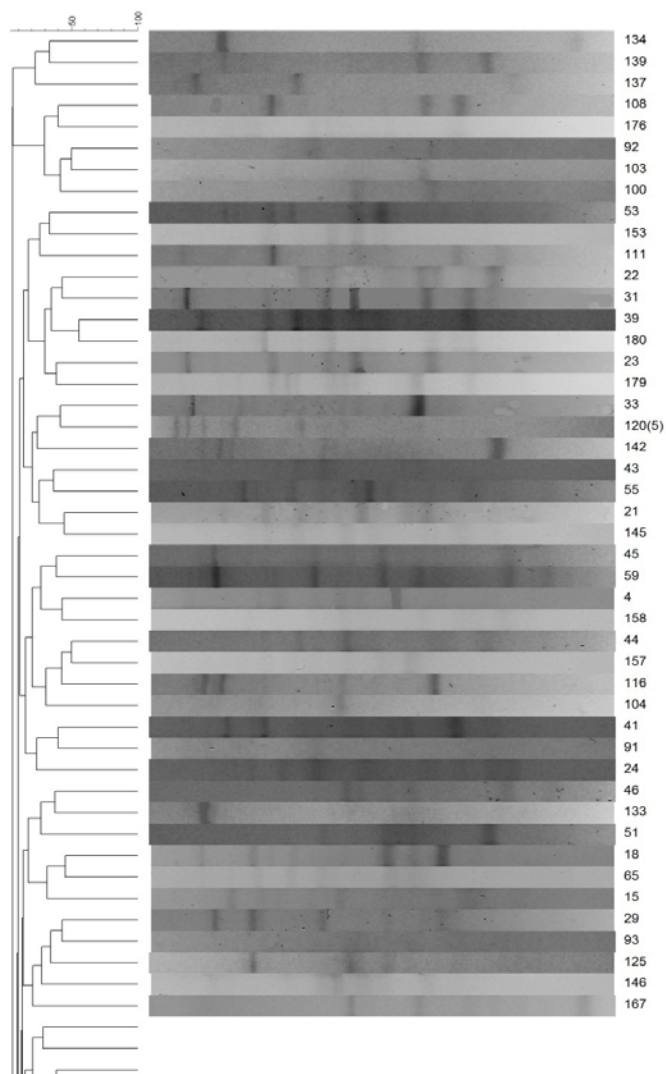
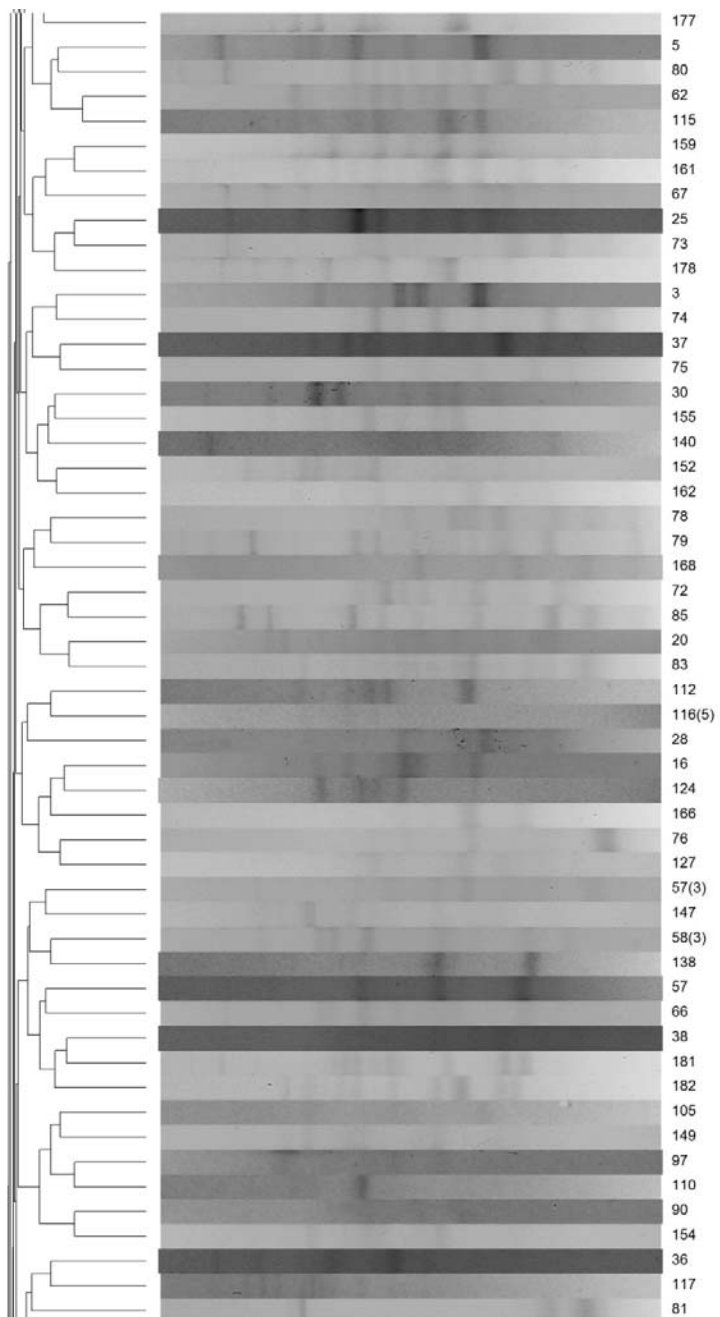


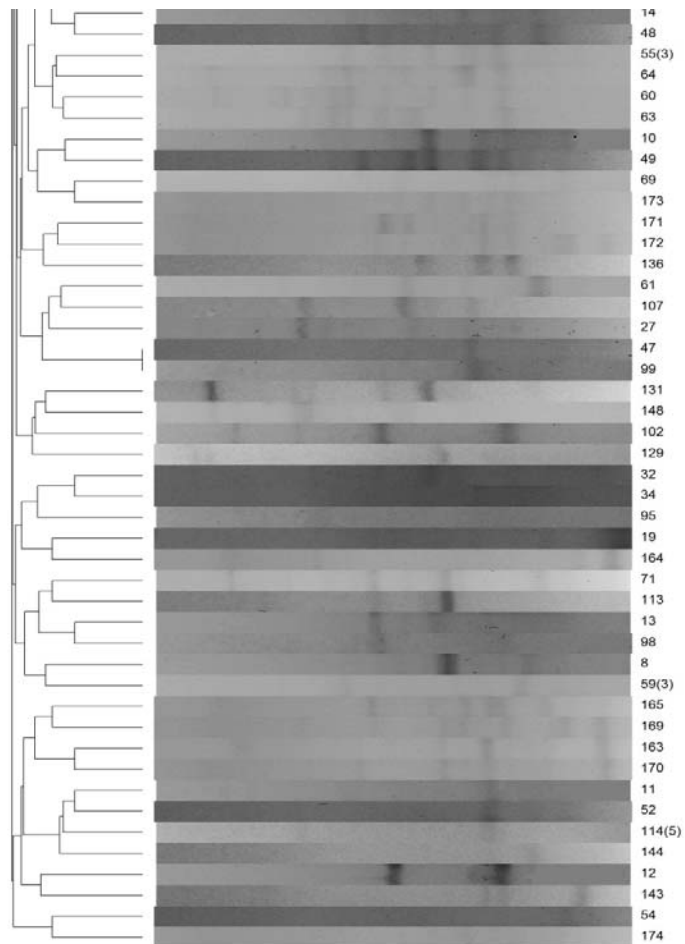
Figura 7 Perfis de bandas REP-PCR *Arthrobacter alkaliphilus*: 15; *Arthrobacter nitroguajacolicus*: 125, 176; *Arthrobacter sp.*: 95, 29, 48, 55, 59(3), 91, 104, 124, 139; *Arthrobacter woluwensis*: 13, 69; *Bacillus acidicer*: 171, 140; *Bacillus cereus*: 14, 23,31, 45, 52, 55(3), 59, 72, 79, 137, 158, 161, 169, 2, 111; *Bacillus drementensis*: 37; *Bacillus luciferensis*: 165; *Bacillus megaterium*: 76, 98, 102, *Bacillus mycoides*: 60; *Bacillus pseudomycoides*: 172; *Bacillus pumilus*: 25, 27, 30; *Bacillus simplex*: 11, 12, 24, 44, 61, 81, 127, 134, 135, 164; *Bacillus sp.*: 58(3), 64, 74, 80, 19, 41, 46, 51, 62, 63,

71, 73, 78, 85, 87, 89, 90, 92, 101, 107, 108, 115, 120 (5), 126, 131, 146, 149, 154, 157, 159, 162, 163, 167, 170, 174, 177, 180, 6; *Bacillus subtilis*: 22, 155, 182; *Bacillus thuringiensis*: 9, 39, 166; *Bacillus vallismortis*: 32, bacilo Gram (+) não identificável: 34, 99, 144; bactéria não cultivada: 66; *Enterobacter aerogenes*: 93; *Enterobacter* sp.: 43; *Hafnia alvei*: 106, 143; *Lysinibacillus boronitolerans*: 181; *Lysinibacillus fusiformis*: 57(3), 133; *Lysinibacillus* sp.: 138, 152, 5, 21, 57, 103, 105, 113, 116(5), 136, 147, 173, 179; *Lysinibacillus sphaericus*: 16, 110, 3, 8, 18, 33, 36, 49, 67, 75, 116, 129, 142; *Lysinibacillus xylanilyticus*: 178; *Microbacterium* sp.: 54, 100; *Paenibacillus alvei*: 10; *Paenibacillus amylolyticus*: 65; *Paenibacillus apiarius*: 145; *Paenibacillus chitinolyticus*: 50; *Paenibacillus polymyxa*: 38; *Paenibacillus* sp.: 97, 112, 148; *Pseudomonas fluorescens*: 20; *Pseudomonas* sp.: 117, 4; *Rhizobium* sp.: 53; *Rummeliibacillus pycnus*: 83; *Serratia marcescens*: 1; *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis*: 151; *Serratia* sp.: 94; *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus*: 168; *Streptomyces* sp.: 114(5), 28, 47; bactéria não cultivada: 86

(...continua...)







### **Identificação dos isolados**

Depois da análise, no programa BLAST, das sequências dos produtos de amplificação do gene 16S rRNA, identificaram-se 13 gêneros bacterianos e distintas espécies dentro deles, junto a um isolado que foi identificado como não cultivado, com 99% de similaridade em relação ao número de acesso JF163288.1 no GenBank (Apêndice A). Estes resultados que constituíram o máximo nível de caracterização, determinaram as distintas OTUs que foram quantificadas em cada ponto de amostragem (Tabelas 5 e 6), a partir dos dados da primeira análise de grupos.

Um total de 39 e 30 OTUs foi detectado nas estações chuvosa e seca, respectivamente. Arcos apresentou a maior riqueza (*S*) na estação chuvosa, na qual os valores oscilaram entre 5 e 12, enquanto na temporada seca esses situaram-se entre 4 e 9, tendo a região de Passos o maior valor de *S*.

Tabela 5 Bactérias identificadas na estação úmida e quantificação de OTUs

OTUs	Região														
	Passos					Arcos					Luminárias				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>			25												
<i>Arthrobacter</i> sp.					36		16	9	4		16	1			1
<i>Arthrobacter</i> sp. (2)									1						
<i>Arthrobacter woluwensis</i>			36							1					
<i>Bacillus acidiceler</i>			9												
<i>Bacillus cereus</i>	12				25		16	4			81	4			
<i>Bacillus drentensis</i>						16									
<i>Bacillus megaterium</i>											1			4	
<i>Bacillus mycoides</i>	27	9	9	9	4	9	1	1	1	1	9	9	9	9	9
<i>Bacillus pumilus</i>					36										
<i>Bacillus simplex</i>		4			1				36			1	25		
<i>Bacillus</i> sp.	3			25		9	9	36	81	9	9		49	9	9
<i>Bacillus</i> sp. (2)							1		4	2		16		16	36
<i>Bacillus</i> sp. (3)							9							9	
<i>Bacillus</i> sp. (4)												81			
<i>Bacillus subtilis</i>				4		1				9					
<i>Bacillus thuringiensis</i>		9				9									
<i>Bacillus vallismortis</i>					1										
Bacilo gram +						4	9		1					9	
<i>Enterobacter aerogenes</i>											1				
<i>Enterobacter</i> sp.						9									
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>									9						
<i>Lysinibacillus</i> sp.	3			16				49							36
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	16	4	9		1	9	1			16	1				
<i>Microbacterium</i> sp.								25						9	
Não cultivada							1								
Não identificada							25								
<i>Paenibacillus alvei</i>		25													

Tabela 5, conclusão

OTUs	Região														
	Passos					Arcos					Luminárias				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>										1					
<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>							1								
<i>Paenibacillus polymyxa</i>						81									
<i>Paenibacillus</i> sp.			9										1		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>				9											
<i>Pseudomonas</i> sp.	118	16		25		9				1				4	
<i>Rhizobium</i> sp.								9							
<i>Rummeliibacillus pycnus</i>														4	
<i>Serratia macescens</i>	3														
<i>Serratia</i> sp.											1				
<i>Streptomyces</i> sp.					36		25								
Riqueza S:	7	6	6	6	8	10	12	7	8	8	8	6	6	7	5

Valores representam o número de UFC de cada OTU/ponto. Valores entre parênteses ( ): OTUs distintas pertencentes ao mesmo gênero. S: número de OTUs/ponto

Tabela 6 Bactérias identificadas na estação seca e quantificação de OTUs

OTUs	Região														
	Passos					Arcos					Luminárias				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>								100							
<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>				4										9	
<i>Arthrobacter sp.</i>				9	49		1								
<i>Bacillus acidicer</i>														36	
<i>Bacillus cereus</i>		16				49	4		25	16	25		25		16
<i>Bacillus luciferensis</i>											25	36			
<i>Bacillus mycoides</i>	39	1	1	4	16	4	9	9	4	4	9	4	25	4	9
<i>Bacillus pseudomycooides</i>														25	
<i>Bacillus simplex</i>				1		4						4			
<i>Bacillus sp.</i>	3	4	1	16		25		16	25	4	16	4	16		16
<i>Bacillus sp. (2)</i>	4	9	1	40	36			9		16	16		49		
<i>Bacillus sp. (3)</i>											4				
<i>Bacillus sp. (4)</i>											9				
<i>Bacillus subtilis</i>										4			16		4
<i>Bacillus thuringiensis</i>												4			
Bacilo gram +								136							
<i>Hafnia alvei</i>	1				4		9								
<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>															9
<i>Lysinibacillus fustiformis</i>					9										
<i>Lysinibacillus sp.</i>		5				64	16		9					9	36
<i>Lysinibacillus sp. (2)</i>							25								
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>		2			9		9								
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>												9			
<i>Paenibacillus apiarius</i>		6			4										
<i>Paenibacillus sp.</i>		5						4	4	16					
<i>Pseudomonas sp.</i>			36												100

Tabela 6, conclusão

OTUs	Região														
	Passos					Arcos					Luminárias				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
<i>Pseudomonas</i> sp. (2)			100												
<i>Serratia marcescens</i> <i>subsp. sakuensis</i>								1							
<i>Staphylococcus</i> <i>saprophyticus</i>													16		
<i>Streptomyces</i> sp.		2													
Riqueza <i>S</i> :	4	9	5	6	7	5	7	7	5	6	7	6	6	6	6

Valores representam o número de UFC de cada OTU/ponto. Valores entre parênteses ( ): OTUs distintas pertencentes ao mesmo gênero. *S*: número de OTUs/ponto

## Índices de diversidade

Comparando-se o índice de Shannon ( $H'$ ) para cada região, considerando simultaneamente as duas estações, observou-se que, em Passos, o ponto B na estação seca atingiu o valor mais elevado (Figura 8).

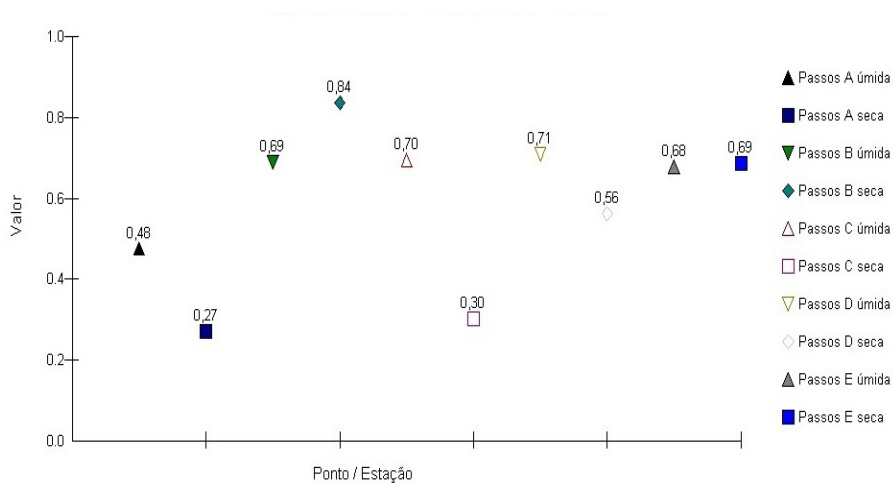


Figura 8 Índice de Shannon ( $H'$ ) da região de Passos nas estações úmida e seca

Nas regiões de Arcos (Figura 9) e Luminárias (Figura 10), o valor desse índice foi maior na estação úmida nos pontos B e D, respectivamente, tendo o  $H'$  do ponto B de Arcos sido o maior dentre os três.



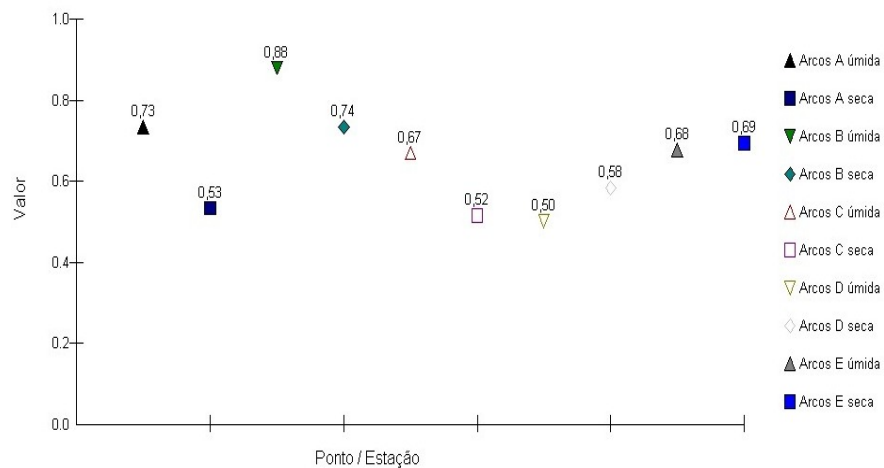


Figura 9 Índice de Shannon ( $H'$ ) da região de Arcos nas estações úmida e seca

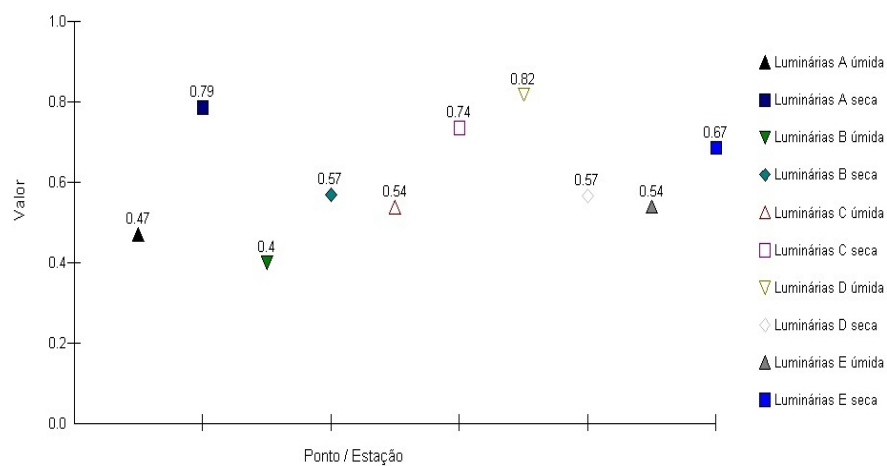


Figura 10 Índice de Shannon ( $H'$ ) da região de Luminárias nas estações úmida e seca

Houve coerência ao comparar os índices de Simpson ( $D$ ) e  $H'$ , já que os maiores valores de  $D$  coincidiram com os menores de  $H'$ , sabendo que  $D$  teria uma relação inversa com  $H'$ . Assim, o ponto A de Passos na estação seca apresentou o maior valor dentre todas as amostras (Figura 11).

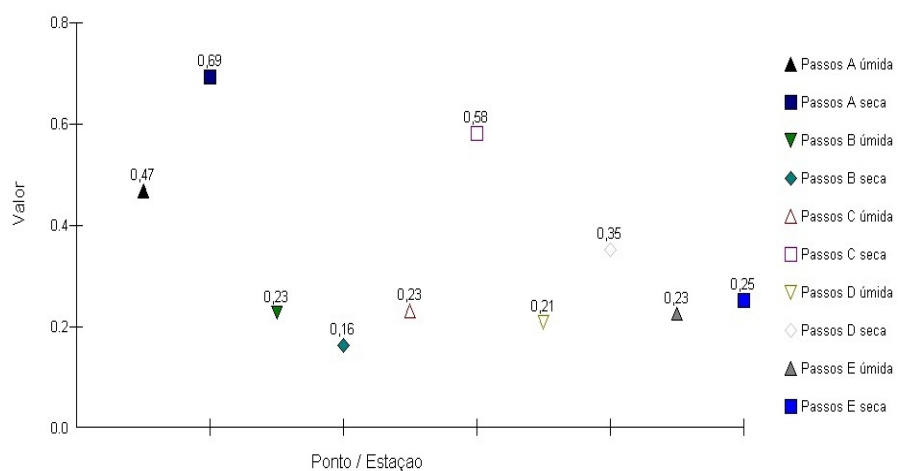


Figura 11 Índice de Simpson ( $D$ ) da região de Passos nas estações úmida e seca

Nas regiões de Arcos (Figura 12) e Luminárias (Figura 13), o valor desse índice foi maior na estação úmida nos pontos D e B, respectivamente.

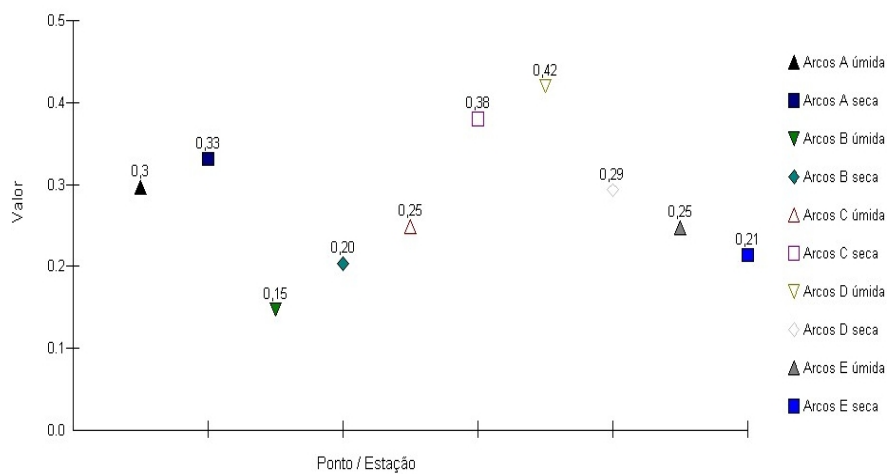


Figura 12 Índice de Simpson ( $D$ ) da região de Arcos nas estações úmida e seca

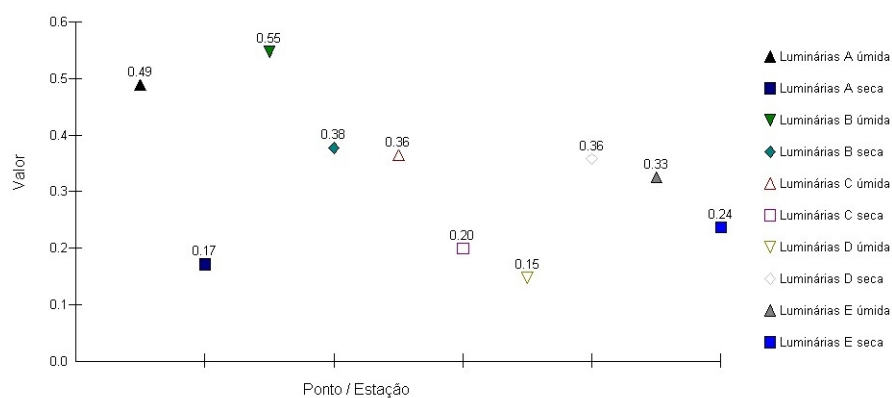


Figura 13 Índice de Simpson ( $D$ ) da região de Luminárias nas estações úmida e seca

Os índices de uniformidade de Shannon ( $J$ ) e recíproco de Simpson ( $1/D$ ) também foram calculados (Tabela 7). Observou-se que  $1/D$  apresentou maior sensibilidade que  $H'$ , comparando-se as amostras das estações chuvosa e seca do ponto E de Passos, ocorrendo a mesma situação no ponto E de Arcos. No entanto, no ponto A de Arcos,  $H'$  foi mais sensível, comparando-se as mesmas condições.

Os valores de  $J'$  oscilaram entre 0,431 e 0,969, correspondendo ao menor ao ponto C de Passos na estação seca e ao maior ao ponto D de Luminárias na época chuvosa. Dentre todos os pontos de amostragem, somente o ponto D de Luminárias na estação úmida coincidiu em ser o mais diverso ( $H'$ ) e uniforme ( $J'$ ).

Tabela 7 Índices de uniformidade de Shannon ( $J'$ ) e inverso de Simpson ( $1/D$ ), nas regiões de Passos, Arcos e Luminárias, nas estações chuvosa e seca

Região/Estação	$J'$				
	Pontos				
	A	B	C	D	E
Passos (u)	0,611	0,885	0,893	0,911	0,752
Passos (s)	0,449	0,877	0,431	0,722	0,811
Arcos (u)	0,733	0,815	0,793	0,555	0,748
Arcos (s)	0,763	0,869	0,61	0,834	0,892
Luminárias (u)	0,521	0,512	0,691	0,969	0,771
Luminárias (s)	0,93	0,73	0,945	0,727	0,882
	$1/D$				
	Pontos				
	A	B	C	D	E
Passos (u)	2,14	4,387	4,335	4,797	4,431
Passos (s)	1,441	6,156	1,719	2,849	3,981
Arcos (u)	3,375	6,794	4,019	2,378	4,041
Arcos (s)	3,021	4,921	2,629	3,412	4,683
Luminárias úm	2,046	1,827	2,747	6,797	3,074
Luminárias se	5,834	2,652	5,024	2,795	4,225

Abreviações: (u) - estação úmida; (s) - estação seca

## Discussão

As mudanças ambientais afetam o estado fisiológico dos microrganismos do solo, gerando distintas respostas às condições de cultivo e, portanto, diversos perfis das comunidades microbianas, podendo a diversidade genética nem sempre ser diferente (Ellis, 2003).

Neste estudo, a diversidade bacteriana do solo do Cerrado brasileiro é abordada mediante uma metodologia dependente de cultivo que, diferentemente dos métodos independentes de cultivo, permite representar, de uma melhor maneira, o perfil de bactérias eutróficas, incluindo gram-positivas com elevado conteúdo de GC (Edenborn e Sexstone, 2007) que são encontradas principalmente em solos não rizosféricos (Smit, 2001). Isto coincidiu com os resultados deste trabalho, em que gram-positivos representaram 84,61% e

86,66% das OTUs nas estações chuvosa e seca, respectivamente, tendo predomínio dos gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus*. Pandey e Palni (1997) também encontraram elevada presença de bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente *B. mycoides* e *B. subtilis*, em solos ácidos por causa do cultivo de chá, em que o pH oscilou entre 4,3 e 6,3, condição similar à deste estudo. Alves-Prado et al. (2010) descreveram a presença de *Lysinibacillus* sp. em solos do Cerrado brasileiro localizados em uma granja experimental na cidade de Selviria, no estado de Mato Grosso do Sul e destacaram a capacidade dessa estirpe de produzir xilanase.

Importante presença tiveram também as OTUs correspondentes a organismos do gênero *Paenibacillus* e *Arthrobacter*, cuja ocorrência no solo é comumente descrita (Gardener, 2004; Smit 2001).

Cinco gêneros de bactérias gram-negativas (*Enterobacter* sp., *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp., *Hafnia* sp. e *Rhizobium* sp.) foram detectados frente à presença dos organismos citados acima. Esta diferença pode ser explicada pelas condições hostis do solo do Cerrado, que inclui elevada concentração de alumínio e baixo pH, características que fazem com que os primeiros sejam mais suscetíveis em relação aos gram-positivos, que possuem estruturas, como o endósporo, que facilitam a tolerância sob essas condições (Gardener, 2004).

Conforme descrito por Lemire et al. (2010), *Pseudomonas fluorescens* apresenta tolerância a altos teores de alumínio. Neste trabalho, identificaram-se vários membros de gênero *Pseudomonas* que, possivelmente, apresentam um mecanismo semelhante de resistência.

A partir do REP-PCR, determinaram-se 148 perfis distintos correspondentes a 48 OTUs. Esta diferença seria explicada pelo fato de que a identificação mediante a análise parcial do gene 16S rRNA em alguns isolados só conseguiu chegar até gênero, principalmente em organismos pertencentes a *Bacillus* sp., *Lysinibacillus* sp., *Paenibacillus* sp. e *Arthrobacter* sp.

Isto ocorreu, por exemplo, no ponto A de Luminárias na estação seca, com 4 OTUs correspondentes a *Bacillus* sp., cujas sequências foram comparadas entre si no programa MEGA 5 e a árvore filogenética gerada mediante o método neighbour-joining (Apêndice B) determinou que foram diferentes. Além disso, OTUs com a mesma denominação em pontos distintos não necessariamente são idênticas. Distintos estudos explicam a dificuldade de diferenciar geneticamente espécies do gênero *Bacillus* e sugerem a utilização de *primers* específicos para a região V1 do gene 16S rRNA (Chen e Tsen 2002; Ferreira et al., 2008). Situação semelhante ocorre no gênero *Paenibacillus*, em que o sequenciamento do gene *nifH* é requerido para diferenciar as espécies fixadoras de nitrogênio (Rosado et al., 1998).

A região de Arcos apresentou as maiores concentrações de alumínio no solo. Elevadas quantidades deste elemento no solo resultam tóxicas para os microrganismos, gerando mutações e causando sua inibição (Wood, 1995). O índice de Shannon ( $H'$ ) registrou o maior valor no ponto B da estação úmida nessa região, onde a concentração de alumínio foi de 1,00 mg/dm<sup>3</sup>. Este teve uma riqueza ( $S$ ) de 12 OTUs, tendo, neste ponto, sido possível isolar uma bactéria que foi identificada como não cultivada, com 99% de similaridade em relação ao número de acesso JF163288.1 no GenBank.

De outra parte, no ponto D de Arcos na estação úmida, a concentração de alumínio foi de 2,4 mg/dm<sup>3</sup> e, embora a riqueza ( $S$ ) tenha sido de 8, relativamente alta dentre as distintas amostras no estudo, este ponto registrou o maior valor do índice de Simpson ( $D$ ) na região, o que significa que houve uma elevada dominância refletida em uma contagem de 36 indivíduos de *Bacillus simplex* e 81 de *Bacillus* sp., de um total de 137 UFC x 10<sup>4</sup>. As OTUs identificadas nesse local são consideradas como saprófitos no solo e, à exceção de *Arthrobacter* sp., são organismos cuja maioria de células viáveis se encontraria, na maioria do tempo, na forma de esporos e que são conhecidos por

sua tolerância a ambientes hostis (Gardener, 2004; Pandey e Palni 1997) que, por sua vez, constituiria uma vantagem seletiva para as OTUs dominantes.

Vários índices ecológicos foram calculados, o que permite um amplo entendimento do estudo da diversidade no solo do Cerrado brasileiro, além de observar variações desde distintas perspectivas frente às mudanças ambientais.

O índice de Shannon-Weaver ( $H'$ ) combina a abundância relativa das OTUs com a riqueza ( $S$ ), refletindo a distribuição da dominância entre as principais espécies da comunidade (Ampe e Miambi 2000). Dessa forma, constitui uma medida da dificuldade de prever a identidade do seguinte organismo dentro dessa comunidade, outorga maior importância a espécies raras do que as comuns, tornando-o mais sensível a mudanças absolutas na abundância (Hill, 2003). O índice de Simpson ( $D$ ), que é um índice de dominância, outorga maior importância a OTUs dominante e pode-se interpretar como a probabilidade de que dois indivíduos selecionados aleatoriamente pertençam à mesma OTU (Peet, 1974). O índice de uniformidade de Shannon ( $J'$ ) derivado de  $H'$  é uma medida da uniformidade absoluta na distribuição de OTUs na comunidade (Peet, 1974). O índice recíproco de Simpson ( $1/D$ ) é também uma medida de diversidade; varia em função da riqueza e da uniformidade que, por ser derivada de  $D$ , é mais sensível a mudanças em OTUs dominantes (Herrera, 2007).

Comparando-se os valores do índice de Shannon ( $H'$ ) entre a estação chuvosa e a seca na região de Passos, observaram-se declínio nos pontos A, C e D; aumento no ponto B e que não houve variação no ponto E. Na região de Arcos houve declínio nos pontos A, B, e C, aumento ponto D e não se observou variação no ponto E. Na região de Luminárias, somente houve declínio no ponto D, enquanto A, B, C e E registraram aumento. Os casos de declínio poderiam ser explicados pela redução na riqueza e aumento na dominância de algumas OTUs, como consequência, principalmente, da diminuição da umidade na estação seca.



Nos casos de aumento de  $H'$ , pode se observar que, geralmente, houve redução na riqueza durante a estação seca, no entanto, a elevada dominância de algumas OTUs, como aconteceu no ponto D de Arcos na estação úmida, influenciou a diminuição de  $H'$ .

Smit et al. (2001) avaliaram a diversidade bacteriana no solo de uma granja experimental, na Holanda e, nas amostras analisadas nos meses de setembro, janeiro, maio e julho, observaram aumento no valor de  $H'$  nos meses de setembro e maio o que, segundo os autores, responde à fertilização no primeiro mês e ao aumento da matéria orgânica no segundo, por causa da queda de material vegetal depois da coleta.

Em conclusão, pelo fato de o Cerrado brasileiro apresentar estações chuvosa e seca bem definidas, neste estudo foi possível evidenciar mudanças na diversidade de bactérias cultiváveis mediante o uso de diferentes índices ecológicos, nas três regiões de estudo, em função das condições sazonais.

Análises mais profundas deverão ser feitas, com o propósito de identificar o isolado apontado como não cultivado, ou determinar se se trata de uma nova espécie.

Neste estudo foi possível evidenciar a presença de 39 e 30 OTUs nas estações chuvosa e seca, respectivamente, distribuídas dentro de 13 gêneros. Posteriores estudos deverão ser realizados para aprofundar a identificação de microrganismos que só foram identificados até o nível taxonômico de gênero.

### **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento do projeto BIOTA MINAS.

## Referências

Alves-Prado HF, Pavezzi FC, Leite RSR, Oliveira VM, Sette LD, DaSilva R. Screening and Production Study of Microbial Xylanase from Brazilian Cerrado. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; 161: 333-346.

Ampe F, Miambi E. Cluster analysis, richness and biodiversity indexes derived from denaturing gradient gel electrophoresis fingerprints of bacterial communities demonstrate that traditional maize fermentations are driven by the transformation process *Int J Food Microbiol* 2000; 60: 91-97.

Bayer LB, Batjes NH, Bindraban PS. Changes in organic stocks upon land use conversion in the Brazilian Cerrado: A review. *Agric Ecosyst Environ* 2010; 137: 47-58.

Bresolin JD, Bustamante MMC, Krüger RH, Silva MRSS, Perez KS. Structure and Composition of Bacterial and Fungal Community in Soil Under Soybean Monoculture in the Brazilian Cerrado. *Braz J Microbiol* 2010; 41: 391-403.

Buscot F. What are soils? In: Buscot F, Varma S, editors. *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Berlin: Springer-Verlag; 2005. p. 3-18.

Calvacanti RB, Joly CA. Biodiversity and Conservation Priorities in the Cerrado Region. In: Oliveira PS, Marquis RJ, editors. *The Cerrados of Brazil Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*. New York: Columbia University Press, 2002. p. 351-368.

Castro AP, Ferraz QB, Pappas G Jr., Silva KA, Leonardecz NE, Kruger R.H. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. *Arch Microbiol* 2008;190: 129-139.

Chen ML, Tsen HY. Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *J Appl Microbiol* 2002; 92: 912-919. Dias BFS. Cerrados: Uma Caracterização. In: Dias BFS editor. *Alternativas de Desenvolvimento dos Cerrados: Manejo e Conservação dos Recursos Naturais Renováveis*. Brasília DF: FUNATURA; 1992. p. 7-26.

Edenborn SL, Sexstone AJ. DGGE fingerprinting of culturable soil bacterial communities complements culturable independent analyses. *Soil Biol Biochem* 2007; 39: 1570-1579.

Ellis RJ, Morgan P, Weightman J fry JC. Cultivation-Dependent and – Independent Approaches for Determining Bacteria Diversity in Heavy-Metal-Contaminated Soil. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 3223-3230.

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Manual de Métodos de Análise de Solos*. 2. ed. Rio de Janeiro, 1997, 212 p.

Ferreira DF. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Sympos* 2008; 6: 36-41.

Ferreira LG, Yoshioka H, Huete A, Sano EE. Seasonal landscape and spectral vegetation index dynamics in the Brazilian Cerrado: An analysis within the

Large-Scale Biosphere-Atmosphere Experiment in Amazônia (LBA). *Remote Sens Environ* 2003; 87: 534-550.

Gardener BBM. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. *Phytopatology* 2004; 94: 1252-1258.

Gevers D, Huys G, Swigs J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 205:31-36.

Giambelluca TW, Scholz FG, Bucci SJ, Meinzer FC, Goldstein G, Hoffman WA, Franco AC, Buchert MP. Evapotranspiration and energy balance of Brazilian savannas with contrasting tree density. *Agric Forest Meteorol* 2009; 149: 1365-1376.

Gomes RC, Semêdo LTAS, Soares RMA, Alviano CS, Linhares LF, Coelho RRR. Chitinolytic activity of actinomycetes from cerrado soil and their potential in biocontrol. *Lett Appl microbial* 2000; 30: 146-150.

Herrera A, Héry M, Stach JEM, Jaffré T, Normand P, Navarro E. Species richness phylogenetic diversity comparisons of soil microbial communities affected by nickel-mining and revegetation efforts in New Caledonia. *Eur J Soil Biol* 2007; 43: 130-139.

Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF. Using ecological measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 2003; 43: 1-11.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT, Williams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9<sup>th</sup> ed. Williams & Wilkins; 1994, 787 p.

Lemire J, mailloux R, Auger C, Whalen D, Appana VD. *Pseudomonas fluorescens* orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminium toxicity. *Environ Microbiol* 2010; 12: 1384-1390.

Lima AS, Nóbrega RSA, Barberi A, Silva K, Ferreira DF, Moreira FMS. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). *Plant Soil* 2009; 319: 127-145.

McAleece N, Gage JDG, Lamshead PJD, Paterson GLJ. Biodiversity Professional statistics analysis software. 1997; Jointly developed by the Scottish Association for Marine and Natural History Museum London.

Motta PEF, Curi N, Franzmeier DP. Relation of Soils and Geomorphic Surfaces in the Brazilian Cerrado. In: Oliveira PS, Marquis RJ, editors. *The Cerrados of Brazil Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*. New York: Columbia University Press; 2002. p. 13-32.

Pandey A, Palni LMS. *Bacillus* specie: The dominant bacteria of the rizosphere of established tea bushes. *Microbiol Res* 1997; 152: 359-365.

Peet RK. The measurement of species diversity. *Annu Rev Ecol Syst* 1974; 5: 285-307.

Pereira GVM, Ramos CL, Galvão C, Dias ES, Schwan RF. Use of specific PCR primers to identify three important industrial species of *Saccharomyces* genus: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, and *Saccharomyces pastorianus*. *Lett Appl Microbiol* 2010; 5:131-137.

Quirino BF, Pappas GJ, Tagliaferro AC, Collevatti RG, Neto EL, Da Silva MRSS, Bustamante MMC, Kruger RH. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. *Microbiol Res* 2009; 164: 59-70.

Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its biodiversity. *Ann Bot* 1997; 80: 223-230.

Rosado AS, Duarte GF, Seldin L, Van Elsas JD. Genetic Diversity of *nifH* Gene Sequences in *Paenibacillus azotofixans* Strains and Soil Samples Analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 2770-2779.

Silva CF, Batista LR, Abreu LM, Dias ES, Schwan RF. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea Arabica*) fermentation. *Food Microbiol* 2008; 25: 951-957.

Smit E, Leeftang P, Gommans S, Van Den Broek J, Van Mil S, Wernars K. Diversity and Seasonal Fluctuations of the Dominant Members of the Bacteria Soil Community in a Wheat Field as Determined by Cultivation and Molecular Methods. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 2284-2291.

Wood M. A mechanism of aluminium toxicity to soil bacteria and possible ecological implications. *Plant Soil* 1995; 171: 63-69.

Zhang L, Xu Z. Assessing bacterial diversity in soil. *J Soil Sediment* 2008; 8: 379-388.

## APÊNDICE

Apêndice A Identificação dos isolados bacterianos procedentes das regiões de Passos, Arcos e Luminárias, durante as estações úmida e seca do ano 2010, com seu correspondente número de acesso (NA) no GeneBank e respectiva percentagem de similaridade (S%)

CM*	Identificação	NºA	S (%)
1	<i>Serratia marcescens</i> strain LF2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">FJ607982.1</a>	99
2	<i>Bacillus cereus</i> strain Wu2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF267369.1</a>	100
3	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain CK5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">EU982902.1</a>	98
4	<i>Pseudomonas</i> sp. MR14 16S ribosomal RNA gene, partial se	<a href="#">JN082731.1</a>	99
5	<i>Lysinibacillus</i> sp. xfchu4 16S ribosomal RNA gene	<a href="#">GQ480496.1</a>	86
6	<i>Bacillus</i> sp. Z-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF912899.1</a>	99
8	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain BK5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">EU982873.1</a>	99
9	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain AIMST Ngse6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF939020.1</a>	100
10	<i>Paenibacillus alvei</i> strain mol19 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">HM031480.1</a>	99
11	<i>Bacillus simplex</i> strain EAS3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF496448.1</a>	99
12	<i>Bacillus simplex</i> strain EAS3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF496448.1</a>	99
13	<i>Arthrobacter woluwensis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain	<a href="#">AB244483.1</a>	99
14	<i>Bacillus cereus</i> strain Wu2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF267369.1</a>	100
15	<i>Arthrobacter alkaliphilus</i> strain LC6 16S ribosomal RNA, partial sequence	<a href="#">NR_041401.1</a>	99
16	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain 120XY10 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">FJ174618.1</a>	99
18	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain CK5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">EU982902.1</a>	99

## Apêndice A, continuação

19	<i>Bacillus</i> sp. SBH-5 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	<a href="#">AB366327.1</a>	99
20	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain S16 16S ribosomal RNA genes, partial	<a href="#">DQ095904.1</a>	99
21	<i>Lysinibacillus</i> sp. MD5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HQ257252.1</a>	85
22	<i>Bacillus subtilis</i> strain SB16 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">FJ608705.1</a>	99
23	<i>Bacillus cereus</i> strain AIMST 7.M4.3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HQ694110.1</a>	98
24	<i>Bacillus simplex</i> strain EAS3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF496448.1</a>	99
25	<i>Bacillus pumilus</i> strain MCM B-884 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">JN701186.1</a>	99
27	<i>Bacillus pumilus</i> strain E5-A	<a href="#">FJ030627.1</a>	98
28	<i>Streptomyces</i> sp. MJM9110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">GU296742.1</a>	99
29	<i>Arthrobacter</i> sp. LC9 gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">AB248530.1</a>	99
30	<i>Bacillus pumilus</i> strain AIMST 10.T5.1 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">HQ694131.1</a>	99
31	<i>Bacillus cereus</i> strain Kt7-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF460754.1</a>	100
32	<i>Bacillus vallismortis</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF912890.1</a>	99
33	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain 32YG8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">FJ174627.1</a>	99
34	Bacilo gram-positivo não identificado		
36	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain AIMST Nmie14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF819704.1</a>	99
37	<i>Bacillus drentensis</i> strain 147X 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">FJ174610.1</a>	99
38	<i>Paenibacillus polymyxa</i> strain 28	<a href="#">HQ259963.1</a>	83
39	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain Z8B-52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HQ238661.1</a>	100
41	<i>Bacillus</i> sp. SGE163(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">HM566689.1</a>	99
43	<i>Enterobacter</i> sp. MTH17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HQ202542.1</a>	99



## Apêndice A, continuação

44	<i>Bacillus simplex</i> strain WA6-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF496501.1</a>	99
45	<i>Bacillus cereus</i> strain AIMST 7.M4.3 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">HQ694110.1</a>	99
46	<i>Bacillus</i> sp. DU38(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">HM567093.1</a>	100
47	<i>Streptomyces</i> sp. JH-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">FJ547385.1</a>	99
48	<i>Arthrobacter</i> sp. S2.TSA.004 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM063855.1</a>	99
49	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain 13651U 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">EU741100.1</a>	99
50	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i> strain 146XG36 16S ribosomal RNA gene,	<a href="#">FJ174604.1</a>	99
51	<i>Bacillus</i> sp. Pc3T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">GU391505.1</a>	92
52	<i>Bacillus cereus</i> strain M2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF836882.1</a>	100
53	<i>Rhizobium</i> sp. b4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">GU975788.1</a>	100
54	<i>Microbacterium</i> sp. PSSUR4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF768719.1</a>	99
55	<i>Arthrobacter</i> sp. S3.TSA.019 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM063926.1</a>	99
55(3)	<i>Bacillus cereus</i> strain CK2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">EU982899.1</a>	99
57	<i>Lysinibacillus</i> sp. xfchu4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">GQ480496.1</a>	95
57(3)	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain 28XG99 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">FJ174606.1</a>	100
58(3)	<i>Bacillus</i> sp. YXE3-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF701981.1</a>	100
59	<i>Bacillus cereus</i> strain 1142 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">JF322975.1</a>	100
59(3)	<i>Arthrobacter</i> sp. LC9 gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">AB248530.1</a>	98
60	<i>Bacillus mycoides</i> strain Y7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM224388.1</a>	95
61	<i>Bacillus simplex</i> strain WA7-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF496503.1</a>	99

## Apêndice A, continuação

62	<i>Bacillus</i> sp. SGE163(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">HM566689.1</a>	100
63	<i>Bacillus</i> sp. ZK4751 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF496857.1</a>	100
64	<i>Bacillus</i> sp. T1(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HQ601014.1</a>	99
65	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> strain CK45 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">EU982919.1</a>	99
67	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	<a href="#">AB116123.1</a>	98
69	<i>Arthrobacter woluwensis</i> strain ED 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM536961.1</a>	97
71	<i>Bacillus</i> sp. ZK4751 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF496857.1</a>	100
72	<i>Bacillus cereus</i> strain Wu2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF267369.1</a>	99
73	<i>Bacillus</i> sp. T1(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HQ601014.1</a>	99
74	<i>Bacillus</i> sp. DG12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JN208202.1</a>	98
75	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain AIMST Nmie14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF819704.1</a>	99
76	<i>Bacillus megaterium</i> strain LFS23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF682064.1</a>	100
78	<i>Bacillus</i> sp. SBH-5 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	<a href="#">AB366327.1</a>	99
79	<i>Bacillus cereus</i> strain Wu2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF267369.1</a>	100
80	<i>Bacillus</i> sp. DB-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF734330.1</a>	99
81	<i>Bacillus simplex</i> strain EAS3-1 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">JF496448.1</a>	99
83	<i>Rummeliibacillus pycnus</i> strain S12Ba-169 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">HQ238617.1</a>	97
85	<i>Bacillus</i> sp. ZK4751 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF496857.1</a>	100
86	Uncultured bacterium clone ncd1893g08c1 16S ribosomal RNA gene,	<a href="#">JF163288.1</a>	99

## Apêndice A, continuação

87	<i>Bacillus</i> sp. SBH-5 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	<a href="#">AB366327.1</a>	88
89	<i>Bacillus</i> sp. ZK4766 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF496872.1</a>	100
90	<i>Bacillus</i> sp. fm1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JN206613.1</a>	99
91	<i>Arthrobacter</i> sp. TSA38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM587734.1</a>	99
92	<i>Bacillus</i> sp. DU76(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">HM567132.1</a>	99
93	<i>Enterobacter aerogenes</i> strain PSB28 16S ribosomal RNA gene	<a href="#">FJ360760.1</a>	99
94	<i>Serratia</i> sp. INBio3020B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM771078.1</a>	98
95	<i>Arthrobacter</i> sp. LC9 gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">AB248530.1</a>	99
97	<i>Paenibacillus</i> sp. T4(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HQ600992.1</a>	99
98	<i>Bacillus megaterium</i> strain CBG_LBI30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF909575.1</a>	100
100	<i>Microbacterium</i> sp. PSSUR4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF768719.1</a>	99
101	<i>Bacillus</i> sp. DU92(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">HM567150.1</a>	99
102	<i>Bacillus megaterium</i> strain CBG_LBI30 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">JF909575.1</a>	100
103	<i>Lysinibacillus</i> sp. xfchu4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">GQ480496.1</a>	95
104	<i>Arthrobacter</i> sp. Ellin178 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">AF409020.1</a>	99
105	<i>Lysinibacillus</i> sp. MD5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HQ257252.1</a>	84
106	<i>Hafnia alvei</i> strain SP19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JN409468.1</a>	95
107	<i>Bacillus</i> sp. TSWCSN12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">GQ284405.1</a>	99
108	<i>Bacillus</i> sp. ZK4751 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF496857.1</a>	100

## Apêndice A, continuação

110	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain AIMST Nmie14 16S ribosomal RNA gene	<a href="#">JF819704.1</a>	97
111	<i>Bacillus cereus</i> strain CBG_LBI7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF909560.1</a>	100
112	<i>Paenibacillus</i> sp. PMSZP4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF768726.1</a>	99
113	<i>Lysinibacillus</i> sp. JBML1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM055765.1</a>	100
114	<i>Streptomyces</i> sp. H7667 16S ribosomal RNA (5) gene, partial sequence	<a href="#">EU871644.1</a>	99
115	<i>Bacillus</i> sp. T1(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HQ601014.1</a>	99
116	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain AIMST Nmie14 16S ribosomal RNA gene	<a href="#">JF819704.1</a>	100
116	<i>Lysinibacillus</i> sp. JBML1 16S ribosomal RNA (5) gene, partial sequence	<a href="#">HM055765.1</a>	99
117	<i>Pseudomonas</i> sp. NII-1025 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM036668.1</a>	99
120	<i>Bacillus</i> sp. Pc3T 16S ribosomal RNA gene, (5) partial sequence	<a href="#">GU391505.1</a>	99
124	<i>Arthrobacter</i> sp. ACT2M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM587732.1</a>	70
125	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> partial 16S rRNA gene, strain MNPB4	<a href="#">FM213395.2</a>	97
126	<i>Bacillus</i> sp. PG-3-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF820106.1</a>	99
127	<i>Bacillus simplex</i> strain EAS3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF496448.1</a>	99
129	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> isolate LB22 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">JF815049.1</a>	98
131	<i>Bacillus</i> sp. 47(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HQ880676.1</a>	98
133	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain M1 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">JF756592.1</a>	99
134	<i>Bacillus simplex</i> strain EAS3-1 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">JF496448.1</a>	99
135	<i>Bacillus simplex</i> strain EAS3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF496448.1</a>	99
136	<i>Lysinibacillus</i> sp. JBML1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM055765.1</a>	99

## Apêndice A, continuação

137	<i>Bacillus cereus</i> strain CBG_LBI14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF909563.1</a>	100
138	<i>Lysinibacillus</i> sp. INBio2924C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM771060.1</a>	89
139	<i>Arthrobacter</i> sp. TSA38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM587734.1</a>	99
140	<i>Bacillus cereus</i> strain SD10B1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">GQ285087.1</a>	99
142	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain 22YG17 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">FJ174625.1</a>	97
143	<i>Hafnia alvei</i> strain SP19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JN409468.1</a>	90
145	<i>Paenibacillus apiarius</i> strain CK30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">EU982912.1</a>	99
146	<i>Bacillus</i> sp. SGE44(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene,	<a href="#">HM566742.1</a>	99
147	<i>Lysinibacillus</i> sp. MEB7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JN680694.1</a>	99
148	<i>Paenibacillus</i> sp. L55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">DQ196464.1</a>	99
149	<i>Bacillus</i> sp. SGE119(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">HM566648.1</a>	98
151	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i> isolate PSB23 16S ribosomal RNA	<a href="#">HQ242736.1</a>	100
152	<i>Lysinibacillus</i> sp. MEB7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JN680694.1</a>	99
153	<i>Bacillus acidiceler</i> strain AIMST 2.Po.13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HQ684016.1</a>	95
154	<i>Bacillus</i> sp. G1DM-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">DQ416797.1</a>	98
155	<i>Bacillus subtilis</i> strain AIMST 10.T18.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HQ694352.1</a>	99
157	<i>Bacillus</i> sp. CPC3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JN700911.1</a>	99
158	<i>Bacillus cereus</i> strain 1142 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF322975.1</a>	100
159	<i>Bacillus</i> sp. DG12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JN208202.1</a>	99
161	<i>Bacillus cereus</i> strain Wu2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF267369.1</a>	99

## Apêndice A, conclusão

162	<i>Bacillus</i> sp. DU38(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM567093.1</a>	99
163	<i>Bacillus</i> sp. O-E18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JN613479.1</a>	99
164	<i>Bacillus simplex</i> strain EAS3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF496448.1</a>	99
165	<i>Bacillus luciferensis</i> strain WA5-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF496489.1</a>	97
166	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain AIMST Ngse6 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">JF939020.1</a>	99
167	<i>Bacillus</i> sp. ZK4766 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JF496872.1</a>	100
168	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. saprophyticus strain L9-9 16S	<a href="#">JF798360.1</a>	99
169	<i>Bacillus cereus</i> strain AIMST 5.Dz.8 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">HQ683904.1</a>	100
170	<i>Bacillus</i> sp. O-E18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JN613479.1</a>	100
171	<i>Bacillus acidiceler</i> strain AIMST 2.Po.13 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">HQ684016.1</a>	97
172	<i>Bacillus pseudomyoides</i> strain ZAQ10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HQ143670.1</a>	99
173	<i>Lysinibacillus</i> sp. JBML1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM055765.1</a>	98
174	<i>Bacillus</i> sp. DU103(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">HM566984.1</a>	100
176	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> strain HR100 16S ribosomal RNA gene,	<a href="#">JF700473.1</a>	98
177	<i>Bacillus</i> sp. SGE39(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">HM566736.1</a>	91
178	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> strain SLS 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">HM068365.1</a>	99
179	<i>Lysinibacillus</i> sp. PRM9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">JN544149.1</a>	95
180	<i>Bacillus</i> sp. BD-31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">GU085229.1</a>	99
181	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i> 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">FJ237498.1</a>	99
182	<i>Bacillus subtilis</i> strain SB16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">FJ608705.1</a>	99

Codificação para o sequenciamento na Macrogen Inc

Apêndice B Árvore filogenética do ponto A da região de Luminárias, durante a estação seca

