

THIAGO SILVA SALES

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE BACTÉRIAS
TERMOTOLERANTES DO SEMIARIDO PARAIBANO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

João Pessoa

2020

THIAGO SILVA SALES

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE BACTÉRIAS
TERMOTOLERANTES DO SEMIARIDO PARAIBANO**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Krystyna Gorlach-Lira

João Pessoa

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S176c Sales, Thiago Silva.

Caracterização fisiológica e análise filogenética de
bactérias termotolerantes do semiárido paraibano /

Thiago Silva Sales. - João Pessoa, 2020.

85 f. : il.

Orientação: Krystyna Gorlach-Lira.

Monografia (Graduação) - UFPB/CCEN.

1. Enzimas extracelulares. 2. Semiárido. 3.
Bacillaceae. I. Gorlach-Lira, Krystyna. II. Título.

UFPB/CCEN

THIAGO SILVA SALES

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE BACTÉRIAS
TERMOTOLERANTES DO SEMIARIDO PARAIBANO**

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

Data: 17 de abril de 2020

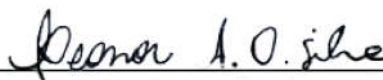
Resultado: APROVADO

BANCA EXAMINADORA:



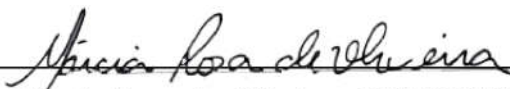
Prof^a. Dra. Krystyna Gorlach-Lira – DBM/CCEN/UFPB

Orientadora



Prof^a. Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva - DBM/CCEN/UFPB

Avaliadora



Prof^a. Dra. Marcia Rosa de Oliveira - DBM/CCEN/UFPB

Avaliadora

Dedico esse trabalho a todos os apaixonados pela ciência. Que todos, assim como eu, possam ter o privilégio de trabalhar com o que amam.

AGRADECIMENTOS

De forma inicial, agradeço as matriarcas da minha família, ao nome de minha digníssima avó Maria do Socorro Silva e minha singularíssima mãe Suênia Cristina Silva de Souza. As quais sempre me proveram com todo os tipos de subsídios a sobrevivência física e mental. Deixo os meus mais sinceros, profundos e mais decorosos agradecimentos, sem vocês eu não conseguiria me apresentar ao mundo, nem muito menos sobressair-me dele.

Ao meu tio Célio Jardel, agradeço por repassar a mim, parte de toda a sapiência que o mesmo adquiriu ao longo dos anos. Suas sábias palavras e ensinamentos são de extrema valia.

Agradeço à minha orientadora Krystyna Gorlach-Lira, por ter me aceito como aprendente no seu laboratório e em consequente, me orientado no TACC. Suas palavras amigas de orientação foram de extrema importância para o meu desenvolvimento como profissional e indivíduo pensante.

Também é imperioso que seja evidenciada a importância que essa instituição de ensino (UFPB) teve, tanto para a minha formação quanto para a o derribamento de paradigmas antes estabelecidos em minha mente, de modo que, esta, não conseguiu sair incólume dessa peleja.

Deixo um agradecimento também, ressaltado a minha doce, seletivamente temporal amásia e abastada melânica Hadassa. Tenho um apreço imenso e decoroso por ti.

Ao longitudinalmente abençoado, latitudinalmente malogrado e virtuoso cidadão Rafael, deixo meu grandiosíssimo agradecimento, por estar sempre ao meu lado em vários momentos da minha vida, acadêmica e pessoal. Enfrentando monstros mentais e reais, é uma amizade recíproca e que espero resguardar ao fim das eras.

Agradeço a belas e gratas surpresas que essa instituição de ensino me trouxe. A Rosângela Targino e Iara Santos, por todo o companheirismo, dedicação e sinceridade demonstradas para comigo durante todos estes anos.

Também agradeço a Lidiane Nascimento, por sempre compartilhar comigo todos os conhecimentos acerca do cosmos e da nossa efêmera existência.

A fidalguia remanescente, defensora da pesquisa e disseminação de conhecimento de qualidade, do laboratório BIOMICRO, as quais relatei minhas desventuras, aflições e vitórias acadêmicas. A Vanessa Espínola, sou grato, pois não

se tem sapiência de como é possível armazenar tanto conhecimento em tão tacanha criatura.

E de forma excepcional, deixo registrados os meus mais profundos e estimáveis agradecimentos a todos os membros do corpo docente institucional, os quais puseram a prova meu condão moral.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta, para a formação do meu caráter e modelo profissional, meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

A Caatinga é um bioma único, mesmo com o avanço da agroindústria, ela é pouco explorada para outras finalidades que não sejam extrativismo vegetal ou agropecuária. As condições ambientais presentes no meio, pressionaram os organismos residentes a terem que se adaptar a fatores diversos, tais como: temperaturas elevadas, escassez de água, exposição à radiação ultravioleta e solos extremamente oligotróficos. Existem poucas informações sobre a microbiota da caatinga, sua diversidade e produção de biomoléculas. O presente trabalho teve como objetivo determinar as características fisiológicas e realizar análise filogenética das bactérias isoladas do solo livre de raízes, solo rizosférico e rizoplane do capim panasco (*Aristida adscensionis* L.) da pastagem nativa (caatinga) da região do São João do Cariri, Paraíba. Foi analisado o crescimento de 36 isolados de bactérias em meios de cultura com diferentes níveis de concentração de nutrientes, bem como na presença de 10% de NaCl. Os isolados foram analisados também com relação a produção de enzimas extracelulares pectinases, proteases e lipases em meios sólidos com seus respectivos substratos: pectina cítrica, caseína e óleo vegetal residual; o uso de açúcares como fonte de carbono, resistência aos antibióticos e análise filogenética na base de sequências de DNAr 16S. Todos os isolados analisados demonstraram o crescimento nos meios agar nutriente, agar nutriente 10x e 100x diluído. Todos os isolados produziram as proteases e a maioria apresentou produção de lipases. Atividade pectinolítica foi observada principalmente nos isolados do rizoplane de *A. adscensionis*. A grande maioria dos isolados apresentou sensibilidade aos antibióticos estreptomicina, cloranfenicol e vancomicina. Nove isolados submetidos a análise molecular pertenceram à família *Bacillaceae* e apresentaram similaridade com as espécies dos gêneros *Bacillus* (7 isolados) e *Anoxybacillus* (2 isolados). Alguns isolados apresentaram um potencial para pesquisas mais detalhadas sobre a produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas.

Palavras-chave: Enzimas extracelulares. Semiárido. *Bacillaceae*

ABSTRACT

The caatinga is a unique biome that, even with the advancement of agroindustry, is still underexplored for ends that are not plant extractivism, agriculture or livestock farming. The present environmental conditions positively pressured the resident organisms to adapt to diverse factors such as high temperatures, water shortage, exposure to UV radiation and extremely oligotrophic soils. There is a little information on caatinga microbiota, about its diversity and production of biomolecules. The present work had the objective to determine the physiological characteristics and perform the phylogenetic analysis of bacteria isolated from root-free, rhizospheric and rhizoplane soil of the grass *Aristida adscensionis* L. of native pasture at the São João do Cariri region, Paraíba state, Brazil. In this work were analyzed 36 isolates of bacteria in culture mediums with different concentrations of nutrients, and at the presence of 10% NaCl. The production of pectinases, proteases and lipases were performed using the respective substrates: citrus pectin, casein and residual vegetal oil. Subsequently, the use of sugars as carbon sources, the resistance to antibiotics and the molecular characterization of the bacterial isolates was done. All analyzed isolates showed growth on the nutrient agar, 10x and 100x diluted nutrient agar. All isolates produced proteases and most of them lipases. Pectinases were produced mostly by isolates of rhizoplane of *A. adscensionis*. The vast majority of isolates showed sensitivity to the antibiotics streptomycin, chloramphenicol and vancomycin. Nine isolates submitted to molecular analysis belonged to the *Bacillaceae* family and showed similarity with the species of the genera *Bacillus* (7 isolates) and *Anoxybacillus* (2 isolates). Some isolates showed the potential for more detailed research on the production of proteolytic and lipolytic enzymes.

Keywords: Extracellular enzymes. Semiarid environment. *Bacillaceae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Escala de classificação dos microrganismos de acordo com a temperatura ótima para atividade metabólica.	28
Figura 2 - Capim panasco (<i>A. adscensionis</i>) da pastagem nativa da região do cariri paraibano	40
Figura 3 - Crescimento de isolados T2R26 (A) e T2RP4 (B) no meio NB/100. crescimento: fraco (A); forte (B).	50
Figura 4 - Crescimento de isolados de bactérias em diferentes meios de cultura....	50
Figura 5 - Crescimento de isolados de bactérias em diferentes temperaturas de incubação.....	51
Figura 6 – Atividade pectinolítica dos isolados T2R3 (A – pectina hidrolase, pH 5,0) e T2RP4 (B – pectina liase, pH 8,0).	56
Figura 7 - Número de isolados do solo livre de raízes, solo rizosférico e rizoplano com atividade pectinolítica.	56
Figura 8 - Número de isolados de solo livre de raízes, solo rizosférico e rizoplano com atividade proteolítica e lipolítica.....	58
Figura 9 - isolados de bactérias lipolíticas (A: T2S1 e T2R14; B: T2R3) em meio de cultura com óleo vegetal residual e rodamina B. as colônias positivas exibem a fluorescência sob irradiação da luz uv	61
Figura 10 - Número de isolados de solo livre de raízes, solo rizosferico e rizoplano com atividade proteolítica e lipolítica capazes de usar os carboidratos como fonte de carbono.	66
Figura 11 - número de isolados de solo, rizosfera e rizoplano resistentes aos antibióticos estreptomicina, cloranfenicol, vancomicina e ácido nalidíxico. est = estreptomicina, clo= cloranfenicol, van= vancomicina e ác. nal = ácido nalidíxico....	70
figura 12 - árvore filogenética de bactérias isoladas do solo (T2S_), solo rizosférico (T2R_) e do rizoplano (T2RP_) de <i>A. adscencionis</i> e de linhagens de bactérias do genbank baseada na comparação das sequencias de rnar 16s, utilizando análise	

neighbour-joining e o modelo kimura 2 parâmetros. os valores de bootstrap mostrados na árvore foram obtidos com base em 1.000 réplicas; nr _ são números de acesso das sequencias do genbank.72

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Crescimento de isolados de bactérias do solo livre de raízes de <i>A. adscensionis</i> em diferentes meios de cultura.	47
Tabela 2 - Crescimento de isolados de bactérias do solo rizosférico de <i>A. adscensionis</i> em diferentes meios de cultura.	48
Tabela 3 - Crescimento de isolados de bactérias do rizoplane de <i>A. adscensionis</i> em diferentes meios de cultura.	49
Tabela 4 - Atividade pectinolítica de isolados de bactérias do solo livre de raízes da pastagem de <i>a. adscensionis</i>	53
Tabela 5 - Atividade pectinolítica de isolados de bactérias do solo rizosférico de <i>a. adscensionis</i>	54
Tabela 6 - Atividade pectinolítica de isolados de bactérias do rizoplane de <i>A. adscensionis</i>	55
Tabela 7 - Atividade proteolítica e lipolítica de isolados de bactérias do solo livre de raízes da pastagem de <i>a. adscensionis</i>	58
Tabela 8 - Atividade proteolítica e lipolítica de isolados de bactérias do solo rizosférico de <i>A. adscensionis</i>	59
Tabela 9 - Atividade proteolítica e lipolítica de isolados de bactérias do rizoplane de <i>A. adscensionis</i>	60
Tabela 10 - Uso de carboidratos como fonte de carbono por isolados de bactérias do solo.	63
Tabela 11 - Uso de carboidratos como fonte de carbono por isolados de bactérias do solo rizosférico de <i>a. adscensionis</i>	64
Tabela 12 - Uso de carboidratos como fonte de carbono por isolados de bactérias do rizoplane de <i>a. adscensionis</i>	65
Tabela 13 - Resistência de isolados de bactérias do solo livre de raízes aos antibióticos.	67

Tabela 14 - Resistência de isolados de bactérias do solo rizosférico de <i>a. adscensionis</i> aos antibióticos.....	68
Tabela 15 – Resistência de isolados de bactérias do rizoplane de <i>a. adscensionis</i> aos antibióticos.	69
Tabela 16 – Quantidade e pureza do dna genômico dos isolados de bactérias do solo (T2S_), solo rizosférico (T2R_) e do rizoplane (T2RP_) de Capim panasco (<i>Aristida adscensionis</i> l.).....	71
Tabela 17 – Identificação dos isolados de bactérias baseada nas sequências parciais de dnar 16s submetidos a análise blast.	72

LISTA DE SIGLAS

Ami – Amilase

ATM - Pressão atmosférica

BIOMICRO - Laboratório de Biologia de Microrganismos

C - Carbono

Ca - Cálcio

Cas – Caseína

CCEN - Centro de Ciências Exatas e da Natureza

Cel – Celulase

CM - Centímetros

CMC - Carboximetilcelulose

Co - Cobalto

CO₂ - Dióxido de Carbono

Cr - Crômio

Cu - Cobre

DBM - Departamento de Biologia Molecular

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EUA - Estados Unidos da América

Fe - Ferro

Fru - Frutose

G - Gramas

Gal - Galactose

Gel – Gelatina

GlcNAc - N-acetil-D-glicosamina

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

K - Potássio

Lac - Lactose

Lip – Lipase

Man - Manose

Mg - Magnésio

ML - Mililitro

MM - Milímetros
MMA - Ministério do Meio Ambiente
Mn - Manganês
Mo - Molibdênio
N - Nitrogênio
Na - Sódio
NACL - Cloreto de Sódio
NAOH - Hidróxido de Sódio
Ni - Níquel
NRPS - Peptídeos não ribossômicos
O2 - Oxigênio
P - Fósforo
PB - Paraíba
Pec – Pectinase
pH - Potencial Hidrogeniônico
PKS - policetídeos sintase
Qui – Quitinase
Raf - Rafinose
rRNA - Ácido ribonucleico ribossômico
RP - Rizoplano
S - Enxofre
Sal - Salicilina
Se - Selênio
UFPB - Universidade Federal da Paraíba
UV - Ultra Violeta
V - Vanádio
W - Tungstênio
Xil - Xilose
Zn - Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 Caracterização de biomas quentes e secos	19
2.2 Condições ambientais do bioma Caatinga	19
2.3 O solo e rizosfera como habitat para microrganismos.....	22
2.4 Condições ambientais como fator limitante para o desenvolvimento de microrganismos no solo.....	26
2.4.1 TEMPERATURA E UMIDADE	27
2.4.2 NUTRIENTES	30
2.5 O gênero <i>Bacillus</i>	31
2.6 Importância de enzimas extracelulares microbianas	32
2.6.1 PECTINASES.....	34
2.6.2 LIPASES	35
2.6.3 PROTEASES	36
2.7 Resistência de microrganismos a antibióticos	36
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Isolados de bactérias.....	40
4.2 Purificação e cultivo de isolados bacterianos em diferentes meios de cultura.....	40
4.3 Análise de atividade das enzimas extracelulares	41
4.3.1 ATIVIDADE PECTINOLÍTICA	41
4.3.2 ATIVIDADE LIPOLÍTICA	42
4.3.3 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA	42
4.4 Uso de carboidratos como fonte de carbono por isolados de bactérias	43
4.5 Resistência dos isolados de bactérias aos antibióticos	44
4.6 Caracterização molecular dos isolados de bactérias.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Crescimento de bactérias em diferentes condições de cultivo	46

5.2 Atividade enzimática dos isolados de bactérias	52
5.2.1 ATIVIDADE PECTINOLÍTICA	52
5.2.2 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA.....	57
5.3 Consumo de carboidratos como fonte de carbono	62
5.4 Resistência microbiana a antibióticos.....	66
5.5 Identificação e análise filogenética dos isolados de bactérias.....	70
6 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

A Caatinga é um bioma único, mesmo em perspectivas atuais ela é pouco explorada para outras finalidades que não sejam extrativismo de madeira ou agropecuária. As condições ambientais desse habitat pressionaram os organismos residentes durante milhares de anos a se adaptar a fatores como temperaturas elevadas, escassez de água, exposição à radiação ultravioleta e solos extremamente oligotróficos.

Quando se trata do conhecimento de biodiversidade local e potencial do uso de espécies para finalidades biotecnológicas, a maioria das pesquisas direcionam as comunidades vegetais como protagonistas, sendo o conhecimento sobre a microbiota do habitat irrisório. O entendimento sobre as funcionalidades das comunidades de microrganismos da Caatinga pode revelar uma vasta quantidade de espécies capazes de produzir biomoléculas que suportam condições ambientais extremas, se mostrando ótimos candidatos para a aplicação no mercado de enzimas e antimicrobianos.

Muitos desses organismos possuem relações benéficas tanto com outros microrganismos como com a comunidade vegetal. Na última se destaca a região de rizosfera (área de contato entre raiz e solo) que demonstra uma microbiota com grande produtividade de biomoléculas e atividade decompositora, estabelecendo a manutenção dos ciclos de C, N e P e mantendo a fertilidade desse solos.

Quando nos direcionamos para as condições de preservação da caatinga vemos um bioma muito degradado por ações antrópicas e frágil para o desenvolvimento de processos como desertificação. Estudos sobre como as comunidades de microrganismos se comportam nessas condições são importantes não só para o interesse industrial, mas também podem ser um grande suporte para restauração desses habitats, a partir do desenvolvimento de soluções biotecnológicas para recuperação desses solos degradados.

Portando o presente estudo teve como objetivo verificar a diversidade fisiológica e filogenética de bactérias isoladas do solo e da rizosfera do capim panasco (*Aristida adscensionis* L.), uma gramínea nativa das pastagens da região de São João do Cariri, Paraíba, avaliando a capacidade de crescimento de bactérias em diferentes

condições, produção de enzimas extracelulares, bem como uso de carboidratos como fontes de carbono e resistência aos antibióticos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização de biomas quentes e secos

Grande parte da extensão dos biomas no planeta são compostas por desertos e regiões semiáridas, sendo equivalente a um total de mais de um terço de toda superfície terrestre (MARES, 2017). As principais características ambientais desses biomas são a baixa precipitação e umidade do ar, uma alta taxa de evapotranspiração, temperaturas elevadas no período diurno com máximas de até 58°C atmosféricos e 78°C na superfície do solo, diversidade geomorfológica, solos geralmente com baixa disponibilidade de matéria orgânica, vida animal, vegetal e microbiana especializada e grande aridez (WARD, 2016).

Podemos categorizar os desertos de acordo com dois fatores, o primeiro deles é temperatura (quente, temperado ou litorâneo), o segundo fator é umidade (hiperárido, árido, semiárido), a biota de organismos mais “complexos” tem tendência a ser endêmica para cada um desses tipos de desertos, já a microbiota tende a possuir um maior limiar de sobrevivência e adaptabilidade, podendo a mesma espécie ser encontrada em mais de um dos habitats já citados. A Caatinga, ambiente em que foram isoladas as bactérias do presente estudo, apesar de ser classificada como um bioma unicamente brasileiro e outras vezes relacionada a savana, ou savana-estépica stricto sensu como é observado em estudo desenvolvido por Fabricante & Andrade (2007), apresenta os fatores que pertencem a categoria de desertos tropicais, semiáridos e litorâneos (LAITY, 2009).

2.2 Condições ambientais do bioma Caatinga

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro que pode ser encontrado em todos os estados do Nordeste ocupando 54% do seu território e porção norte do estado de Minas Gerais, possui cerca de 844.453 quilômetros quadrados, ocupando cerca de 11% de todo território nacional. Grande parte dessa área possui condições climáticas adversas e uma precipitação média anual menor que 800 mm (SILVA et al., 2004). Cerca de 20% de toda a precipitação anual da Caatinga ocorre em um único dia, e 60% em um único mês, essas taxas podem variar de acordo com as condições

atuais do ambiente. A temperatura na Caatinga é um fator limitante e pode variar entre 23 e 27°C atmosféricos, com máximas superiores a 32°C, na camada superficial do solo essa temperatura chega a um valor ainda mais crítico podendo superar 60°C. Os valores persistem com baixos índices de oscilação na temperatura média da região, sendo o principal fator de alteração a altitude, como podemos observar nos brejos interioranos (extensões mais elevadas situadas em meio a Caatinga, que podem apresentar um clima tropical úmido ou subúmido fresco, e podem desenvolver uma vegetação com características tanto de Floresta Atlântica como de Caatinga, algumas regiões que podemos encontrar esses brejos são o planalto da Borborema, Chapada do Araripe entre outros) (MENEZES et al., 2012).

O bioma apresenta também umidade relativa do ar abaixo de 50% com ventos fortes e secos, devido a essas condições a evapotranspiração é muito elevada, sendo em média 1500 mm ao ano, resultando em secas que podem perdurar de 7 a 11 meses ao ano, a relação de todos os fatores ambientais já citados é o que caracteriza a aridez da paisagem (KILL et al., 2007).

Apesar da desvalorização errônea da Caatinga como um habitat com baixa diversidade florística e o conhecimento quase nulo sobre a microbiota (esta que sempre se encontra associada a vegetação e é imprescindível para sobrevivência da mesma), o bioma é muito diverso em espécies endêmicas, com um complexo tipo de vegetação de plantas lenhosas, herbáceas e xerófilas e hiperxerófilas, sendo os representantes das famílias Leguminosae e Cactaceae os mais abundantes e número de espécies (GIULIETTI, 2003; QUEIROZ, 2002; TAYLOR & ZAPPI, 2002).

Em todo o Brasil, segundo dados oficiais do ministério do meio ambiente, cerca de 1.338.046 quilômetros quadrados e 1.482 municípios estão em regiões susceptíveis a ocorrência de desertificação. Quando direcionamos essa problemática para a Caatinga observamos que mais da metade de todo o bioma já sofreu algum dano devido a fatores antrópicos, e entre 15% e 20% do bioma demonstram um alto grau de degradação, ou seja, já estão em processo de desertificação, todos os estados do Nordeste com exceção do estado do Maranhão possuem núcleos de desertificação, os estados mais afetados são Bahia, Ceará, Pernambuco e Paraíba a mesma sendo a mais afetada, cerca de 71% de todo o seu território se encontra comprometido de alguma forma por ações antrópicas, o solo de regiões em processo de desertificação tendem a possuir uma classificação Bruno Não Cálculo e Litólicos,

estes sensíveis aos processos de erosão (ACCIOLY, 2010; BRASIL, 2004; RODRIGUES et al., 2016).

Segundo Souza et al. (2015) no estado da Paraíba, 208 municípios, cerca de 46.004 quilômetros quadrados apresentam zonas com alto grau de degradação e ocorrência de desertificação, na região fisiográfica do Planalto da Borborema a microrregião dos Cariris Orientais é a mais afetada de todas. São João do Cariri município este em que foram isoladas as bactérias do presente estudo está situado em um desses núcleos de desertificação. Através de dados coletados da plataforma meteorológica do INMET podemos classificar o clima de São João do Cariri como semiárido quente com médias de 25°C, chuvas escassas e um período chuvoso curto com média pluviométrica de 380 mm ao ano. Barbosa (2007) define a vegetação no município como Caatinga hiperxerófila, sendo as espécies mais abundantes: jurema (*Mimosa tenuiflora*), marmeleiro (*Croton sonderianus*) pereiro (*Aspidosperma pyrifolium*) mandacaru (*Cereus jamacaru*) e xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) e capim panasco (*Aristida adscensionis* L.).

Para Souza et al. (2011), o principal fator relacionado a degradação e aceleração do processo de desertificação é a antropização causada por humanos, esta acarreta a condições como rarefação ou ausência de uma cobertura vegetal, um solo exposto a insolação e com redução de matéria orgânica, leva ao empobrecimento e rápida erosão, aumento da evapotranspiração da área afetada e concentração de sais no solo.

Sousa et al. (2008) associou quais eram as principais atividades relacionadas a rapidez da antropização causada pelos humanos no município de São João do Cariri, e foi definido que as principais causas são a utilização da lenha que é a fonte energética mais utilizada para atividades caseiras ou industriais, agropecuária extensiva (bovinos, ovinos e caprinos) que é a principal atividade econômica da microrregião e a que provoca o maior impacto, pressão e redução de indivíduos da vegetação devido ao pastejo, compactação do solo por pisoteio dos animais e uso de queimadas para produzir novas pastagens ou novas áreas de plantio para autoconsumo. Essas atividades em conjunto as características ambientais do bioma, dificultam a recuperação e favorecem o aparecimento de áreas abertas que podem beneficiar espécies oportunistas ou organismos especializados, formando assim nichos específicos para esse tipo de ambiente.

Sabendo da importância dos microrganismos para a estabilidade de um ecossistema, e a capacidade que atividades antropogênicas como agricultura, uso de pesticidas e poluição do solo tem de afetar a composição físico-química do solo influenciando assim a biodiversidade microbiana local, se pode aferir que mudanças da microbiota podem desestabilizar o equilíbrio do habitat na superfície e no subterrâneo (KIRK et al., 2004).

2.3 O solo e rizosfera como habitat para microrganismos

Berendsen et al. (2012) define o solo como o habitat que apresenta maior diversidade de vida em todo o planeta, relaciona a dinamicidade biológica e a relação intrínseca entre todos os organismos presentes, sejam eles da fauna, flora ou microbiota através de condições como sinergismo, antagonismo, parasitismo e a mais comum saprofitismo, e elucida sua importância para manutenção e equilíbrio do habitat, sendo os microrganismos um dos principais responsáveis por essa manutenção através de atividades como degradação de matéria orgânica, retornando nutrientes para o solo através de um ciclo contínuo.

De acordo com Moreira & Siqueira (2002) quando se analisa meticulosamente o solo, se pode distinguir a constituição básica de cada um deles, seja mais arenoso ou argiloso, ou uma mistura de ambos que gera solos heterogêneos, esse fator acarreta na formação de agregados (micro-habitats), que podem se distinguir fisicamente, devido maiores proporções da matéria base (areia, argila ou silte), ou quimicamente, por maiores concentrações ou ausência de compostos orgânicos e inorgânicos. A soma de todos esses fatores faz com que cada agregado gere um micro-habitat específico, as proporções de areia, argila ou silte, podem limitar a disponibilidade de oxigênio, nutrientes e dará ao solo um melhor ou pior suporte físico para aderência de microrganismos, por exemplo, algumas bactérias no solo através da produção de polissacarídeos extracelulares interagem com partículas de argila, a formação do complexo argila-polissacarídeos é tão forte que as bactérias persistem fixadas as moléculas de argila mesmo após sua morte, essas características promovem a formação de um micro-habitat que suporte a vida de microrganismos especializados ou com uma diversidade de metabolismos distintos (DUCHIELA et al., 2013; HUANG & BOLLAG, 1998).

A microbiota do solo é muito diversa, sendo composta por bactérias, fungos, microalgas e pequenos animais como protozoários, nematoides e rotíferos. Para o presente trabalho será salientado o domínio Bacteria, este que é o grupo mais numeroso e de grande importância nos vários tipos de solo, atuando na decomposição e síntese de matéria orgânica, fixação de nitrogênio, nitrificação e desnitrificação, oxidação e redução de elementos minerais e mineralização e imobilização de nutrientes (STAMFORD, 2005). Esta biodiversidade é de grande importância para manutenção do solo, a partir do momento em que muitos organismos possuem diferentes atividades fisiológicas e importância ecológica para o micro-habitat que residem, a redução ou perda de biodiversidade pode influenciar na alteração dos ciclos biológicos e prejudicar a funcionalidade do solo tanto para comunidade microbiana como para as comunidades de plantas dependentes destes ciclos (BEVER et al., 2012).

Brandão (1992) estipulou a população bacteriana de solo em uma grandeza de 10^8 e 10^9 unidades formadoras de colônias por cada grama de solo. Já Torsvik et al. (2009) estimou que para cada grama de solo existiria um total de dez mil espécies de bactérias. Apesar dos valores categoricamente muito elevados, o espaço ocupado em solo por microrganismos corresponde a uma proporção mínima, ocupando menos de 5% de todo o espaço disponível (INGHAM et al., 1985).

Quando se trata de diversidade bacteriana no solo, NANNIPIERI et al. (2017) afirma que as populações apresentam disposição heterogênea, ou seja, existem pontos com uma concentração menor de bactérias e existem *hotspots*, áreas com maior diversidade de atividade biológica, essas zonas podem se formar por diversos fatores: propriedades físico-químicas do solo, agregados de matéria orgânica particulada, adubo de animais e a rizosfera. Os gêneros de maior representatividade no solo são *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Derxia*, *Micrococcus*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobium* e *Thiobacillus* (FIERER & JACKSON, 2006).

O termo rizosfera foi utilizado pela primeira vez pelo agrônomo Lorenz Hiltner, ele a descreveu como área em torno da raiz da planta habitada por microrganismos que se beneficiam de compostos químicos liberados a partir de exsudatos radiculares, também associou o fator que esses exsudatos poderiam atrair microrganismos que possam ser benéficos para planta, como organismos capazes de assimilar nitrato e

amônio, mas também podem atrair microrganismos que podem se adaptar a condição rizosférica e trazer algum malefício para o vegetal (HILTNER, 1904).

Atualmente a rizosfera é classificada como uma zona crítica em torno de raízes circunvizinhas do solo, influenciada por substâncias secretadas das plantas, grande diversidade de microrganismos e pontos de picos de atividade metabólica, interação microbiana e trocas genéticas (TKACZ et al., 2015). Outras definições como a de BAIS et al. (2006) descreve a rizosfera como regiões do solo que são influenciadas pela raiz de plantas, promovendo o enriquecimento do solo com nutrientes, através das secreções de exsudatos orgânicos a partir da raiz, estes que são atrativos para microrganismos quimiorganotróficos oportunistas, que podem ser benéficos ou maléficos para o vegetal. A concentração de nutrientes dispostos pela planta através dos exsudatos pode variar durante a vida da raiz, logo, a dinamicidade e diversidade de microrganismos varia com o tempo, mesmo com estas variações a rizosfera é um ambiente favorável ao crescimento de microrganismos, podendo a população bacteriana atingir valores até 50% superiores as populações de solo sem raízes (HOPKINS & HUNER, 1995). Em estudo desenvolvido por Barret et al. (2011) é observado a grande diferença na abundância de microrganismos da rizosfera em comparação ao solo sem raízes, quando relacionamos o fator diversidade essa diferença não se torna expressiva, já que a comunidade rizosférica é formada por organismos originalmente dos solos sem raízes atraídos por nutrientes disponibilizados pelas plantas.

O tipo de solo, espécie de planta e até mesmo a morfologia da raiz são fatores limitantes que restringem a extensão da rizosfera, mas admitisse que essa área se delimita da superfície da raiz até alguns milímetros ou centímetros de solo periférico (WILLADINO et al., 2005). A rizosfera pode ser dividida em três zonas distintas, a partir da mais próxima até a mais distante em relação a raiz: a endorrizosfera é primeira, composta pelo córtex e endoderme da raiz; o rizoplano é a segunda zona, composta pelo epiderme, mucilagem e células corticais da raiz, estas frequentemente invadidas por microrganismos; a última zona é definida como ectorrizosfera se estende do rizoplano até toda a porção de solo periférico afetado pela raiz (CAMPBELL & GREAVES, 1990; CAVAGLIERI et al., 2009).

O solo rizosférico possui características únicas diferindo do solo sem raízes, por exemplo, o pH de solos rizosféricos podem diferenciar em uma ou duas unidades a mais ou menos dos solos sem raízes, esse fator está relacionado as concentrações

das formas de nitrogênio absorvidos pelas plantas. Outra característica que difere é a composição iônica, a mesma também está relacionada a absorção das formas de nitrogênio e posterior efluxo dos íons pelas raízes. Além das concentrações de gases como dióxido de carbono (CO_2) e oxigênio molecular (O_2) e concentrações de matéria orgânica (WILLADINO et al., 2005).

A relação entre microbiota e plantas é bidirecional, podendo uma beneficiar a outra, por exemplo, associações entre rizóbios e leguminosas favorecem a absorção de compostos nitrogenados, já que estas bactérias fixam de 40% a 50% do nitrogênio da biosfera, enquanto plantas secretam por volta de 40% de seus fotossintatos na rizosfera (UDVARDI & POOLE, 2013). Ou maléficas através da invasão das células do córtex por bactérias ou fungos patógenos, provocando danos ou até mesmo morte dessas células. As plantas podem alterar a composição da rizosfera através dos exsudatos, alterando pH, promovendo competição ou até mesmo favorecendo o crescimento de microrganismos capazes de inibir a proliferação de organismos patógenos através de compostos antimicrobianos, todos estes fatores podem formar solos supressivos. A diversidade de processos que ocorrem na rizosfera através do metabolismo da planta não é só necessária para saúde do vegetal, mas ele influencia diretamente na dinâmica do ecossistema, selecionando microrganismos específicos para ocupar a rizosfera, logo comunidades na rizosfera de espécies distintas também irão apresentar uma biodiversidade particular (CARDOSO et al., 2011; HAWES & BRIGHAM, 1992; MENDES et al., 2011).

A relação de espécies de vegetais está muito associada a comunidade microbiana na rizosfera, onde a mesma influencia diretamente as condições daquele ecossistema através da ciclagem e fixação de nutrientes, favorecendo e influenciando nas características e produtividade da comunidade vegetal, exercendo um limiar de retroalimentação que propicia o aumento da biomassa microbiana. Com o aumento da biomassa não se espera um enriquecimento de diversidade, os organismos da rizosfera podem exercer funções distintas das que eram exercidas pela espécie no solo, logo, uma baixa diversidade de microrganismos resulta em um acréscimo no número de funções que beneficiam a comunidade microbiana e os vegetais (LADYGINA & HEDLUND, 2010; ROMAGNOLI & ANDREOTE, 2016).

2.4 Condições ambientais como fator limitante para o desenvolvimento de microrganismos no solo

Uma série de condições são necessárias para um ótimo desenvolvimento da vida microbiana, entre elas estão: disponibilidade de nutrientes, fontes de carbono, energia, minerais, fatores de crescimento, composição iônica, disposição de água, pressão, pH, radiação, temperatura, umidade, potencial de oxido-redução, situação da superfície, relações espaciais, variabilidade genética dos microrganismos e interação entre eles, logo, a natureza não é inerte e esses fatores tendem a mudar a medida que o tempo passa, alterando as características do solo e gerando novas dinâmicas sucessionais nos micro-habitats (NANNIPIERI et al., 2017).

A capacidade da vida microbiana se adaptar e sobreviver as adversidades e condições ambientais é extraordinária, podemos encontrar estes organismos em qualquer parte, sobrevivendo nos ambientes mais extremos do planeta, locais estes onde vários parâmetros ambientais estão próximos do limite mínimo ou máximo requerido para suportar a existência da vida. Tais ambientes a muito considerados impossíveis de suportar vida agora são conhecidos por sua gama de espécies endêmicas e extremamente especializadas (LÓPEZ-GARCIA, 2007).

A Caatinga por si é considerada um bioma que pode apresentar características de um ambiente extremo, devido as condições naturais observadas, sendo estas modificadas através da antropização causada pelos humanos e o acelerado aumento do número de núcleos de desertificação (PRADO, 2003). A temperatura no solo pode atingir mais de 60°C, além disso, os microrganismos desse ambiente estão expostos a um enorme estresse hídrico, temperaturas elevadas, variação de pH de acordo com a composição de cada tipo de solo e mudanças desse pH através de atividades antrópicas como agropecuária, além da alta exposição à radiação ultravioleta. O acúmulo de todos estes fatores e condições em um ambiente pode favorecer a seleção de organismos extremófilos (SALCEDO et al., 1997).

Segundo Seckbach e Oren (2007) extremófilos são qualquer forma vida que possua a capacidade de sobreviver e se desenvolver em ambientes com variáveis extremas, seja temperaturas muito elevadas ou mínimas, pH ácido ou alcalino, ambientes muito salinos, com alta exposição à radiação ou pressão elevada. Podemos encontrar extremófilos nos três domínios da vida, principalmente em Achaea e Bacteria, dentro de Eukarya os seres do reino Fungi são os possuem o maior número

representantes de extremófilos. Os organismos que suportam sobreviver em tais condições, podem ser explorados para diversas finalidades, seja no mercado de enzimas, ou para fins astrobiológicos, através deles podemos entender qual é o limiar para existência da vida e se a mesma poderia existir em outros corpos celestes. Apesar de já existirem registros de extremófilos em ambientes não extremos, em sua grande maioria eles necessitam destas condições adversas para manter seu metabolismo ativo e se desenvolverem (CARDOSO et al., 2011).

Os microrganismos possuem um estado dinâmico, se adaptando de acordo com os parâmetros ambientais devido a uma diversidade de características genotípicas e fenotípicas, como a modificação de síntese enzimática, regulação das taxas de absorção dos nutrientes disponíveis, redirecionamento ou redução de atividades metabólicas e dormência. A dormência é uma das principais medidas de sobrevivência microbiana em situações adversas, sendo esta uma característica bem desenvolvida durante a história evolutiva destes organismos, é notável diferenças morfológicas entre as estruturas de repouso como mixósporos (δ -Proteobacteria), akinetes (Cyanobacteria), exósporos (Actinobacteria) e endósporos (Firmicutes), as últimas sendo as formas de dormência mais bem sucedidas evolutivamente. A esporulação fornece ao organismo a capacidade de suportar condições desfavoráveis durante meses ou anos em diversos tipos de ecossistemas e retornar seu metabolismo e divisão celular a normalidade assim que as condições estiverem favoráveis (ROSZAK & COLWELL, 1987; JUNIER et al., 2019; PAUL et al., 2019).

2.4.1 TEMPERATURA E UMIDADE

A temperatura é um dos principais fatores limitantes para processos físicos, químicos e biológicos no solo, estando intrinsicamente relacionado ao crescimento e atividade metabólica dos microrganismos, logo, alterações na temperatura podem induzir a mudanças em toda a comunidade microbiana. A relação temperatura e processos metabólicos é complexa, pois atua diretamente na estrutura e função de biomoléculas, além da manutenção e integridades das estruturas celulares, por exemplo, o aumento de temperatura acelera as reações de catálise enzimática, mas se o ambiente chegar a temperaturas muito elevadas, a enzima se torna inativa e pode ser desnaturada. A maioria dos organismos de solo possuem um aumento nas suas

taxas metabólicas em faixas de temperatura mesófilas, ou seja, entre 10°C a 25°C (PIETIKÄINEN et al., 2005; VORONEY, 2007).

Não obstante, diversas comunidades microbianas podem se tornar ativas à medida que a temperatura se torna ótima para o seu desenvolvimento e multiplicação, o aumento de atividade biológica em relação a temperatura se dá a medida que ocorre uma reestruturação destas comunidades de microrganismos, com o aparecimento de organismos psicrófilos (menos que 20°C), mesófilos (entre 20°C e 40°C), termófilos (mais de 50°C), hipertermófilos (acima de 80°), ambientes que são geotermicamente estáveis tendem a exercer pressão seletiva sobre a microbiota local, selecionando organismos termotolerantes que podem crescer em uma variada faixa de temperatura ou termófilos obrigatórios (COTTA, 2016; MADIGAN et al., 2016).

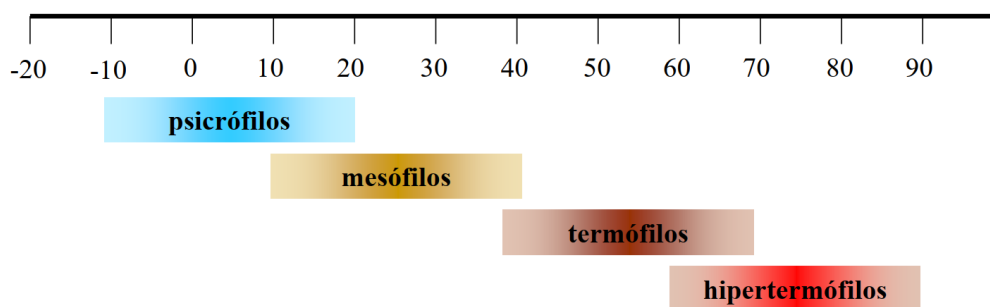


Figura 1 – Escala de classificação dos microrganismos de acordo com a temperatura ótima para atividade metabólica.

Fonte: Cardoso & Andreote, 2016.

Termófilos por definição são organismos que possuem um melhor crescimento e atividade metabólica em temperaturas acima de 50°C, podem ser encontrados em diversos ecossistemas, como solos, lagos, fontes termais ou até mesmo em ambientes termais artificiais, como em aquecedores (ROCCO et al., 2001). A termotolerância está relacionada a capacidade dos microrganismos manterem homeostase funcional independente de mudanças de temperatura no ambiente externo, muitos organismos da microbiota termotolerante podem ser isolados em regiões tropicais ou semiáridas, a maioria destes possuem um crescimento ótimo a temperaturas em torno de 35°C à 45°C podendo crescer em temperaturas superiores a 60°C ou inferiores a 30°C. É proposto que cepas termotolerantes expressão fenótipos específicos, se adequando as condições do habitat que o microrganismo

está inserido, sendo estes organismos totalmente distintos de termófilos obrigatórios (MATSUSHITA, 2016).

As ordens de Bactérias com maior número de representantes termófilos e termotolerantes no solo são Bacillales, Clostridiales e Thermoanaerobacterales, podemos encontrar estes organismos em diversos ambientes, estando classificados de acordo com as condições ambientais que se encontram, como acidófilos, neutrófilos, alcalófilos, aeróbios, anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos, quimiorganotróficos e quimiolitotróficos (GOMES et al., 2016).

Adaptações na membrana, proteínas e DNA dos microrganismos são condições necessárias para uma maior tolerância a variações no gradiente de temperatura, sendo crucial para estabilidade estrutural e molecular destes organismos. As proteínas termofílicas são de grande interesse devido possuírem a composição semelhante de proteínas mesófilas, sendo constituídas pelos vinte aminoácidos comuns, mas com a capacidade de não desnaturarem à medida que a temperatura se eleva, essa condição está relacionada a diferenças na sequência, com a substituição de apenas alguns aminoácidos críticos ao longo da enzima que permitem o dobramento com certa rigidez, mas que mantem a termoestabilidade; a estrutura proteica possui um maior número de ligações iônicas entre aminoácidos ácidos e básicos e tende a ser muito hidrofóbica; além de diferenças nas dinâmicas e propriedades termodinâmicas entre mesófilos e termófilos. A compreensão dos mecanismos relacionados a constância térmica das proteínas de microrganismos termófilos e termotolerantes é de grande interesse para o desenvolvimento de enzimas termofílicas com melhor atividade catalítica em reações bioquímicas para fins biotecnológicos e industriais (GOMES et al., 2016; MADIGAN et al., 2016; PICA & GRAZIANO, 2016).

A umidade é um dos principais fatores limitantes para o desenvolvimento da vida microbiana, a disponibilidade de água e a porosidade do solo influencia diretamente nas populações de microrganismos, estando relacionada diretamente a atividade biológica, influência na aeração, quantidade de materiais solúveis, pressão osmótica, pH, difusão de nutrientes, motilidade microbiana, potencial redox e temperatura no solo (COTTA, 2016; LIPCZYNSKA-KOCHANY, 2018).

A relação de temperatura e umidade do solo, são os fatores que afetam mais fortemente a atividade biológica no solo, principalmente pela alteração das taxas de catálise enzimática. Em solos que a água está em concentrações normais e a umidade

não se torna um fator limitante, a atividade metabólica dos microrganismos depende quase que exclusivamente da temperatura, em contramedida quando a proporção de água no solo reduz e ele se torna mais seco, a umidade é promovida para o principal fator limitante que rege as atividades metabólicas da microbiota (VORONEY, 2007).

O aumento da temperatura e redução de umidade, eleva as taxas de evapotranspiração, aumentando a rotatividade de matéria orgânica, e ampliando a perda de carbono nos minerais e solo orgânico, essa perda restringe diretamente funções do solo, o tornando pobre, com baixa retenção de água e afetando diretamente a biomassa microbiana (KARMAKAR et al., 2016). TRUU et al. (2017) também estimou que a relação do aumento de temperatura com a baixa umidade dos solos tem efeito muito negativo na respiração microbiana, alterando as taxas de difusão de gases e nutrientes. A inconstância dessas condições devido mudanças climáticas influenciam diretamente na transformação de nitrogênio do solo (mineralização, nitrificação e desnitrificação) alterando fortemente o ciclo de nitrogênio, afetando negativamente a vegetação do ecossistema e por consequência as comunidades de solos sem raízes e rizosféricos.

2.4.2 NUTRIENTES

A disponibilidade e concentração de nutrientes na natureza é um fator determinante para o florescimento da vida, sendo dependente da deposição de matéria orgânica através da morte de formas de vida ou inorgânica por diversos ciclos biogeoquímicos. Os solos são os ecossistemas que apresentam a maior quantidade de reservas nutricionais do planeta, muito dessa característica está relacionada a constante deposição de matéria orgânica proveniente de atividades biológicas, como carbono e formas de nitrogênio (nitrato e amônia), grande diversidade de nutrientes minerais, como Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, K, S, P, Mo, Co, W, V, Cu, Cr, Na, Ni e Se, além dos constituintes atmosféricos como oxigênio e nitrogênio, estes elementos sendo constituintes das principais moléculas relacionadas ao metabolismo dos microrganismos de solo, estes que por sua vez possuem uma diversidade maquinários capazes de utilizar os nutrientes disponíveis de diferentes formas (CARDOSO et al., 1992; COTTA, 2016; MADIGAN et al., 2016).

A matéria orgânica é a principal fonte energética para o metabolismo da microbiota de solo, entretanto a mesma não está distribuída de forma uniforme, sendo

que a maior parte da deposição ocorre em regiões mais rasas do solo (0 a 20 cm de profundidade) ou em áreas próximo de raízes, a disponibilidade finita de nutrientes acomete uma disputa em que o microrganismo beneficiado será o melhor adaptado a absorver e converter esses nutrientes em energia, organismo não adaptados e adaptados irão morrer e fazer parte das concentrações de matéria orgânica local, promovendo a manutenção e continuidade da vida (RASCHE & CADISH, 2013).

Os solos de regiões áridas ou semiáridas tendem a ser oligotróficos, ou seja, com baixa disponibilidade de nutrientes minerais e matéria orgânica, o mesmo padrão é observado nos solos do semiárido nordestino. Maior parte das comunidades microbianas de solo é litotrófica e usa carbono e compostos orgânicos como fonte de energia, em casos de escassez de carbono uma rota alternativa para os microrganismos seria o consumo de açúcares, em áreas como a Caatinga as bactérias são os principais decompositores e responsáveis pela ciclagem do carbono e nitrogênio, estas tendem a se adaptar e especializar a baixa disponibilidade de recursos, temperaturas elevadas e estresse físico e hídrico, mesmo microrganismos rizosféricos em micro-habitats com menor pressão seletiva e maior disponibilidade de nutrientes mantem as suas características de resistência e oligotrofia (MARTINS et al., 2010; ARAÚJO et al., 2014).

Atividades antrópicas no semiárido nordestino como a retirada da vegetação nativa, o uso inadequado do solo de forma exaustiva na agricultura, além do pisoteio de animais que torna os solos mais compactos, acarreta em processos acumulativos que aceleram os efeitos da desertificação e favorecem uma redução notável da capacidade de produção, retenção de água e empobrecimento do solo, acarretando em uma perda significativa da biomassa vegetal e microbiana e como consequência redução da biodiversidade local (TRAVASSOS & SOUZA, 2011).

2.5 O gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* foi descrito pela primeira vez por Cohn (1872) e atualmente é classificado como pertencente ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Bacillales e família Bacillaceae. São facilmente caracterizados por sua forma de bastonete, podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos, positivos para coloração em Gram, formadores de endósporo, organotróficos ou litotróficos e com um amplo espectro fisiológico. São cosmopolitas, sendo assim, seus representantes são encontrados em

todos os habitats possíveis na natureza, vários tipos de solos e condições ambientais, associados de forma parasitaria ou simbiote com tecidos vegetais e animais, sedimentos marinhos e fontes termais (LOGAN et al., 2009; CONNOR et al., 2010).

As relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Bacillus* é incerta sendo o grupo definido como polifilético, e a maioria dos representantes não apresentando uma história evolutiva em comum. A variedade fenotípica em *Bacillus* dificulta a classificação filogenética e a relação com os outros gêneros pertencentes a família Bacillaceae, o que resulta na adição de um grande número de espécies ao gênero, as árvores filogenéticas produzidas através da base de sequencias do gene 16S rRNA separou as espécies de *Bacillus* em dois grandes grupos, o clado *Bacillus subtilis* e o clado *Bacillus cereus*, além disso, devido a relação difusa dentro do grupo a quantidade de espécies tende a variar entre 344 (LIU et al., 2018), até em perspectivas mais atuais de 293 espécies e subespécies (BHANDARI et al., 2013; PATEL & GUPTA, 2020)

O gênero *Bacillus* é composto por organismos com grande importância médica, econômica e histórica, possuindo influência direta na vida humana. Dentro do gênero podemos encontrar espécies muito patogênicas como *B. anthracis* causador da doença sistêmica Antraz, está por sua vez quase sempre letal se não tomado os devidos cuidados, a mesma já foi utilizada como arma biológica por grupos terroristas e *B. cereus* causador de intoxicações alimentares; espécies utilizadas na agricultura, como *B. velezensis* que produz metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento de patógenos e promover o crescimento de plantas; Além de *B. subtilis*, *B. wakoensis* e *B. clausii* muito utilizados para fins biotecnológicos na produção de antibióticos e enzimas; além da grande importância do *B. subtilis* como organismo modelo para diversos feitos, sendo utilizado até para fins astrobiológicos, tais como sobrevivência na exosfera da Terra ou em outros corpos celestes (CONNOR et al., 2010; NICHOLSON et al., 2018; CORTESÃO et al., 2019; PATEL & GUPTA, 2020).

2.6 Importância de enzimas extracelulares microbianas

As enzimas extracelulares estão presentes em todos os tipos de solo, os principais produtores dessas moléculas orgânicas são os microrganismos, mas é possível encontrar outras formas de vida capazes de sintetizar essas enzimas como plantas e animais. Apesar da baixa concentração de enzimas extracelulares no solo,

são imprescindíveis para dar início a catálise das reações metabólicas dos microrganismos, estão relacionadas a continuidade das transformações bioquímicas no sistema solo-planta e nos ciclos dos compostos orgânicos e macronutrientes essenciais como C, N, P e S (ALISSON et al., 2010).

Os picos de atividade enzimática, estes que se relacionam a síntese de carbono orgânico e mineralização de nitrogênio e fosforo estão relacionados a composição atual do solo, ou seja, o habitat deve possuir um valor considerável da biomassa composta por microrganismos viáveis, condições físico-químicas (temperatura, umidade e pH) favoráveis, como também proporções consideráveis de matéria orgânica (ALISSON et al., 2007). Devido as condições oligotróficas do solo, o mesmo se torna um ambiente hostil para uma grande variedade de enzimas extracelulares, estas podendo ser desnaturadas, adsorvidas ou inativas, não só por fatores ambientais, mas também por enzimas proteolíticas de outros microrganismos (BURNS, 1982).

A disponibilidade de recursos no ambiente é finita, logo os microrganismos dispõem de mecanismos para regulação de produção enzimática. Os principais mecanismos regulatórios são a indução e repressão, que podem acentuar a produção da enzima somente quando houver um potencial benéfico para o microrganismos. A regulação se dá a partir de fatores genéticos à medida que um promotor interage com moléculas indutoras ou repressoras, estas que identificam a disponibilidade de recursos naquele micro-habitat. Mesmo enzimas que não possuem alto potencial regulatório de produção, são induzidas a possuir atividade apenas em condições específicas do meio, além disso concentrações mais elevadas de catabólicos como a glicose ou aminoácidos, inibem a atividade enzimática através de repressão de transcrição de genes das enzimas ou mesmo pode ocorrer inibição competitiva pela própria enzima (HANIF et al., 2004; ALISSON et al., 2010).

A demanda por enzimas extracelulares microbianas cresce exponencialmente todos os anos nos setores industriais. Apesar da variedade de possíveis formas de obtenção dessas enzimas, as fontes microbianas são de maior interesse industrial devido ao baixo custo, alta taxa de produção em períodos curtos, maior disponibilidade, melhor estabilidade a alterações físico-químicas, além da ampla diversidade bioquímica desses compostos e propensão a manipulação genética no intuito de oferecer maior produção destes compostos (BANERJEE & RAY, 2017).

Entre as enzimas extracelulares microbianas com finalidade biotecnológica se destacam as celulases, amilases, pectinases, lipases e proteases.

2.6.1 PECTINASES

A pectina é um polissacarídeo amplamente encontrado na parede celular de diversos tipos de vegetais. É formado a partir de cadeias lineares de ácido D-galacturônico através de ligações α -1,2 e α -1,4 (HARLOT et al., 2010).

As pectinases são enzimas pertencentes a família das polissacaridasas e são responsáveis por hidrolisar as ligações glicosídicas da cadeia carbônica que compõe os compostos pécticos, estes que são macromoléculas ácidas, complexas e com alto peso molecular, presentes na parede celular dos vegetais (PRATHYUSHA & SUNEETHA, 2011). As enzimas pectinolíticas podem ser classificadas de acordo com o local de hidrólise, ou seja, se a clivagem ocorrerá de forma randômica ou na porção terminal do esqueleto galacturônico, como também pela preferência de substrato e catálise enzimática por transeliminção ou hidrólise (ALKORTA et al., 1998). As pectinases podem ser distinguidas em três grupos: pectina esterase (desesterificante ou desmetoxilante) capazes de remover grupos metil éster da cadeia de pectina; enzimas despolimerizantes (hidrolases e liases) catalizadoras da hidrólise dos compostos pécticos e as protopectinases que catalisam a transformação de protopectina em pectina (UENOJO & PASTORE, 2007).

KAVUTHODI & SEBASTIAN (2018) relatam que alguns gêneros de bactérias como *Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Micrococcus*, possuem enorme potencial na produção de pectinases, destacando as espécies *B. subtilis*, *B. pumilus* e *B. polymyxa* devido à alta eficiência na produção destas enzimas. As pectinases tem ampla utilidade no mercado, estando relacionadas a atividades como processamento de frutas; extração de óleos vegetais; na indústria têxtil; produção de biocombustível e ração animal; reciclagem de papeis usados; indústria de vinhos, fermentação de café e chá; melhoramento da extração de amido de plantas e indústria de papel e celulase (JAYANI et al., 2005; GARG et al., 2016).

2.6.2 LIPASES

Os lipídeos são compostos orgânicos muito diversos na natureza, que apresentam uma variedade de composições químicas distintas, mas possuem em comum a característica de insolubilidade em água. Podemos encontrar lipídeos executando diversas funções nos organismos desde armazenamento energético como gorduras e óleos; compondo estruturas de membranas biológicas como fosfolipídios e esteróis; hormônios e mensageiros intracelulares; cofatores enzimático, além de uma grande diversidade de outras funções (NELSON & COX, 2018).

As lipases são as enzimas responsáveis por hidrolisar os lipídeos, são classificadas como serina-hidrolases e diferem das esterases pelo substrato que hidrolisam. A primeira hidrolisa ésteres carboxílicos de acilglicerol de cadeia longa (≥ 10 átomos de carbono) e a segunda hidrolisa ésteres carboxílicos de acilglicerol de cadeia curta (≤ 10 átomos de carbono), também é possível diferenciar as duas enzimas pela composição de aminoácidos e distribuição eletroestática da superfície da proteína (FOJAN et al., 2000; ALI et al., 2012).

As lipases hidrolisam as ligações de éster de tri-, di- e monoglicerídeos, formando ácidos graxos e glicerol. A catálise enzimática por lipase possui uma reação bifásica, ou seja, além da hidrólise comum existe uma fase orgânica imiscível, contendo o substrato hidrofóbico na água (KAPOOR & GUPTA, 2012).

Lipases são enzimas que possuem grande demanda industrial devido a sua estabilidade em solventes orgânicos, como também sua ação em uma grande diversidade de substratos, seletividade e capacidade de catalisar reação sem a adição de cofatores custosos. São utilizadas na indústria de alimentos, farmacêutica, energia, têxteis, papel e celulose; na produção de detergentes e agentes de limpeza, fármacos, produtos químicos finos, além de aplicações médicas e em biorremediação e processos ambientais (HANSAN et al., 2006).

Os gêneros de bactérias de solo com representantes utilizados na produção de lipases são *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Geobacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces* (CASAS-GODOY et al., 2018).

2.6.3 PROTEASES

Proteínas são macromoléculas compostas por várias ligações peptídicas que unem sequências de aminoácidos, essas ligações permitem a rotação da estrutura proteica permitindo diversas conformações singulares. Apesar desse fator, proteínas tendem a possuir composição química e estrutura tridimensional única, alterações nessas conformações tendem a inativar ou alterar sua função. São moléculas com uma enorme diversidade de funções e podem ser hidrolisadas de formas distintas (NELSON & COX, 2018).

As proteases são as enzimas responsáveis por decompor as proteínas através da hidrólise de suas ligações peptídicas. São moléculas que não possuem especificidade de substrato, logo, reconhecem o ponto exato de hidrólise através do lado carboxílico de um aminoácido (GARCIA-CARREON & DEL TORO, 1997).

Essas enzimas são divididas em dois grupos: as endopeptidases moléculas de ação endócrina, ou seja, atuam clivando ligações peptídicas de aminoácidos não terminais na parte interna da molécula e as exopeptidases estas hidrolisam as ligações peptídicas na porção terminal C ou N no final da cadeia polipeptídica da proteína (NANNIPIERI et al., 2012). Segundo Contesini et al. (2018) as proteases são classificadas em nove famílias de acordo ao seu mecanismo de ação, são elas: aspártico (A), cisteína (C), glutâmico (G), metalo (M), asparagina (N), misto (P), serina (S), treonina (T) e enzimas desconhecidas (U).

O gênero *Bacillus* apresenta grande número de espécies produtoras de enzimas proteolíticas. É de grande interesse industrial devido ao seu fácil crescimento em diversos tipos de substratos e grande capacidade de produção. Dentro do gênero as espécies que mais se destacam são *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. gibsonii* e *B. pumilus* (STEFANOV et al., 2018). As enzimas proteolíticas são de grande demanda e utilidade nas indústrias alimentícias, farmacêutica, têxteis e de couro; e na produção de detergentes e peptídeos bioativos (CONTESINI et al., 2018).

2.7 Resistência de microrganismos a antibióticos

Os solos são ambientes muito heterogêneos e oligotróficos, esse fator faz com que ele seja um ambiente extremamente competitivo, para um microrganismo sobreviver a essa condição ele precisa desenvolver métodos para reduzir os números

de organismos concorrentes, e a produção de antimicrobianos é a forma mais efetiva para inibir o crescimento desses outros organismos, sendo assim a capacidade de produzir e resistir a ação desses antimicrobianos é um fator limitante para a proliferação e continuidade da espécie (DUNDORE-ARIAS et al., 2019).

A síntese de antimicrobianos está relacionada a diversas vias metabólicas, através da ação de duas famílias de proteínas, as policetídeos sintase (PKS) e as peptídeos não ribossômicas (NRPS), o primeiro é capaz de sintetizar policetídeos, que é uma classe de compostos bioativos, caracterizado pela capacidade de alternância entre os grupos carbonil e metileno (STAUNTON & WEISSMAN, 2001), o segundo produz peptídeos independentes de RNA mensageiro e de máquinas ribossômicas, devido a enorme similaridade estrutural e funcional dessas proteínas elas são capazes de gerar genes híbridos que demonstram produzir moléculas com ação antimicrobiana (FISCH, 2013; WALSH, 2016).

Resistência é a capacidade permanente ou temporária de um organismo e sua progênie sobreviver e permanecer viáveis para multiplicação após a exposição a compostos que inibiriam essa condição. As substâncias antimicrobianas geralmente agem sob as funções respiratórias e constituição da membrana plasmática, enzimas e material genético. As bactérias reagem a bactericidas de formas distintas, devido a sua diferente composição de membrana e proteínas não favoráveis a ação do composto, além do desenvolvimento a resistência por exposição ou troca gênica (CLOETE, 2003).

De acordo com Björkman et al. (2000) os fatores relacionados ao desenvolvimento de resistência bacteriana são: o volume e exposição ao composto antimicrobiano, os custos necessários do organismo para atingir aptidão a resistência e a capacidade de compensar geneticamente esses custos, a resistência obtida por plasmídeos ou cromossômicas causam perdas de condicionamentos em outras atividades daquele microrganismo.

Uma das formas mais efetivas de adquirir resistência á antibióticos é através da transferência horizontal, ou seja, a transferência de material genético para células que não são descendentes, esse processo ocorre através de plasmídeos, fagos ou captação de DNA (THOMAS & NIELSEN, 2005). O plasmídeo é considerado o DNA extracromossômico que possui a capacidade de se autorreplicar independente do genoma, e são a principal forma de disseminação de resistência a antibióticos (ROBICSEK et al., 2006). Devido a fácil captação do plasmídeo e a facilidade em que

o mesmo tem de transpassar barreiras entre espécies e gêneros ele pode se tornar um problema à medida que a transferência aumenta em comunidades heterogêneas, assim, à medida que a resistência é passada entre as comunidades e diferentes nichos, organismos que não eram expostos a antibióticos podem adquirir resistência (DIONISIO et al., 2002).

Um problema atual são os antimicrobianos utilizados na pecuária para manter a saúde e produtividade dos animais, além de conferir resistência a possíveis patógenos a microbiota local também pode ser favorecida devido ao enriquecimento do solo a partir do estrume, com a entrada de antibióticos não dissolvidos ou mesmo através da microbiota do animal (VAN BOECKEL et al., 2015; ARUN et al., 2017).

Uma característica distinta de micro-habitats de solo é a propriedade da fase sólida em adsorver moléculas como proteínas e ácidos nucleicos, podendo ser protegidos durante longos períodos contra proteólises e nucleases ou desnaturação devido fatores ambientais, ainda sim bactérias daquele micro-habitat possuem a capacidade de captar esses ácidos nucleicos e inserir o gene de resistência no seu DNA cromossômico. (NIELSEN et al., 2006; NANNIPIERI et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar as características fisiológicas e realizar análise filogenética das bactérias isoladas do solo livre de raízes, solo rizosférico e rizoplane do capim panasco (*Aristida adscensionis* L.) do semiárido Paraibano.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de crescimento dos isolados de bactérias em diferentes meios de cultura;
- Avaliar a produção de pectinases, lipases e proteases em meios sólidos com os substratos específicos;
- Analisar o uso dos açúcares (celobiose, frutose, galactose, manose, rafinose, xilose e salicina) por isolados de bactérias como fonte de carbono;
- Analisar a resistência dos isolados de bactérias aos antibióticos (estreptomicina, cloranfenicol, vancomicina e ácido nalidíxico).
- Identificar e classificar filogeneticamente os isolados de bactérias na base de análise de sequências de DNAr 16S.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados de bactérias

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMICRO) do Departamento de Biologia Molecular (DBM), Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da Universidade Federal da Paraíba. Os isolados utilizados fazem parte de uma coleção de bactérias pertencentes ao BIOMICRO obtida pelo Coutinho (2001) a partir do solo sem raízes e rizosfera de capim panasco (*Aristida adscensionis* L.) da região dos Cariris Orientais no município de São João do Cariri – PB (07° 23' 27" S, 36° 31' 58" W). Os isolados foram denominados como T2S_ para isolados de solo, T2R_ para isolados do solo rizosférico e T2RP_ para isolados de rizoplane. Os isolados foram armazenados em Eppendorf com água destilada estéril.



Figura 2- Capim panasco (*A. adscensionis*) da pastagem nativa da região do Cariri paraibano. Fonte: Google Imagens, 2020.

4.2 Purificação e cultivo de isolados bacterianos em diferentes meios de cultura

As células bacterianas armazenadas em tubos de eppendorff com água estéril foram inoculadas utilizando uma alça bacteriológica em placas de Petri contendo ágar nutriente diluído 10 vezes – NB/10 (HASHIMOTO & HATTORI, 1929) apresentando os seguintes componentes: 2,5 g caldo nutriente HiMedia (peptona 5,0 g, cloreto de sódio 5,0 g, extrato de carne 1,5 g e extrato de levedura 1,5 g), 15 g de ágar, 1000 mL

de água destilada. A purificação dos isolados foi feita utilizando a técnica de esgotamento, que consiste em depositar uma parte do material biológico na placa e depois espalhar com a alça em partes distintas, obtendo progressivamente quantidades menores de material e colônias bacterianas isoladas, além de verificar se o estoque de células possui alguma contaminação. Após a obtenção das culturas com as colônias separadas nas placas com meio NB/10, os isolados foram repicados para o mesmo meio e foram feitos novos estoques de bactérias.

Os isolados foram testados quanto ao crescimento em meio ágar nutriente e ágar nutriente 100x diluído (NB/100). O meio NB/100 possui os mesmos componentes diferindo apenas na concentração reduzida para 0,25 g de caldo nutriente.

Os isolados foram analisados também quanto a capacidade de crescimento na presença de 10% de NaCl. Os isolados foram repicados com auxílio de uma alça bacteriológica em placas de Petri contendo o meio ágar R2A (Difco), contendo 18 g do meio (0,5 g de extrato de levedura, 0,5 g de proteose peptona N°3, 0,5 g casaminoácidos, 0,5 g de dextrose, 0,5 g de amido solúvel, 0,3 g de piruvato de sódio, 0,3 g de fosfato dipotássio, 0,05 g de sulfato de magnésio e 15 g de ágar, 100g de NaCl, 1000 ml de água; o meio foi autoclavado durante 15 min, a uma temperatura de 121 °C e 1 atm. Após a inoculação os isolados foram incubados durante 7 dias a 30 °C. Após a incubação foi observado o crescimento dos isolados.

4.3 Análise de atividade das enzimas extracelulares

4.3.1 ATIVIDADE PECTINOLÍTICA

A produção de pectinases foi avaliada no meio proposto por Hankin, Zucker e Sands (1971), contendo 0,5 g de ácido péctico, 0,5 g de extrato de levedura, 3 g de fosfato monopotássico, 0,1 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,14 g de cloreto de cálcio di-hidratado e 15 g de ágar para 1000 ml de tampão fosfato (pH 8,0) ou tampão acetato (pH 5,0). O meio com pH 8,0 é utilizado para a detecção de pectina liase e meio com pH 5,0 para detecção de pectina hidrolases (poligalacturonases). Os isolados foram incubados em placas de Petri a uma temperatura de 50 °C por 4 dias.

Para visualização do halo formado a partir da hidrólise do substrato foi utilizado a solução de Lugol concentrado (1,0 g de iodo, 2,0 g de iodeto de potássio e 300 ml de água destilada). O diâmetro do halo de degradação de pectina foi medido com

auxílio de uma régua, sendo os resultados correlacionados a uma média aritmética dos valores observados e classificadas como: ≤ 10 mm atividade baixa; ≤ 20 mm atividade alta; ≤ 30 mm atividade muito alta.

4.3.2 ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A produção de lipases foi avaliada no meio proposto por Kouker & Jaeger (1987) com modificações. Inicialmente foi preparado um meio básico composto por 6,0 g de caldo nutriente HiMedia (peptona 5,0 g, cloreto de sódio 5,0 g, extrato de carne 1,5 g e extrato de levedura 1,5 g), 1,25 g de extrato de levedura, 10,0 g de ágar para 450 ml de água destilada e uma emulsão de óleo vegetal residual, composta por 50 ml de água destilada, 250 μ L de Tween 80 e 30 ml de óleo vegetal residual. O corante rodamina B (1 mg/mL) foi preparado dissolvendo 0,050 g do corante em 50 ml de água destilada estéril.

O meio básico, emulsão do óleo vegetal residual foram autoclavados separadamente durante 15 min, a uma temperatura de 121 °C e 1 atm. A solução de rodamina foi esterilizada utilizando os filtros de porosidade 0,2 μ L.

Alíquota de 20 ml da solução de rodamina foi adicionada a emulsão do óleo vegetal residual, sendo miscigenado suavemente, e logo após foi retirado 50 ml da solução e adicionado ao meio básico. O meio foi misturado no Blender estéril até obter meio homogêneo.

Os isolados foram inoculados e incubados em temperaturas 37 °C e 50 °C por 2 dias.

A detecção de atividade lipolítica se dá através da fluorescência de cor laranja no halo da colônia quando colocado em exposição a luz UV 350 nm, a ausência de fluorescência laranja indica ausência de atividade enzimática.

4.3.3 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A produção de proteases foi avaliada no meio ágar-leite proposto por Rabinovitch e Oliveira (2015), composto por 50,0 g de leite em pó desnatado, 5,0 g de peptona de carne, 3,0 g de extrato de carne e 15,0 g de ágar para 1000 ml de água destilada.

No preparo do meio foi utilizado 200 ml de água destilada para reconstruir o leite, que logo depois foi autoclavado durante 20 min, a uma temperatura de 121 °C e 1 atm. A peptona e extrato de carne, além do ágar foram dissolvidos em 800 ml de água destilada com o auxílio do agitador magnético. Após ajustar o pH (7,0) com NaOH o meio foi autoclavado durante 15 min, a uma temperatura de 121 °C e 1 atm. Depois de resfriar foi adicionado os 200 mL de leite assepticamente a composição de extrato e peptona de carne, sendo homogeneizado e plaqueado. Após inoculados os isolados foram incubados a uma temperatura de 30°C durante 7 dias.

A visualização do halo formado a partir da hidrólise do substrato de caseína é direta, passível de serem observados os halos transparentes em torno das colônias.

O diâmetro do halo de degradação de caseína foi medido com auxílio de uma régua, sendo os resultados correlacionados a uma média aritmética dos valores observados e classificadas como: ≤ 10 mm atividade baixa; ≤ 20 mm atividade alta; ≤ 30 mm atividade muito alta.

4.4 Uso de carboidratos como fonte de carbono por isolados de bactérias

Os isolados foram testados com relação a capacidade de utilizar diferentes carboidratos como uma fonte de carbono, foi utilizado o meio proposto por Rabinovitch e Oliveira (2015). Inicialmente foi preparado um meio básico composto por 1,0 g de fosfato diamônico, 0,2 g de cloreto de potássio, 0,2 g do sulfato de magnésio heptahidratado, 0,2 g do extrato de levedura, 0,006 g de púrpura de bromocresol e 22,0 g de ágar para 1000 ml de água destilada.

Todos os compostos foram dissolvidos em água destilada com o auxílio do agitador magnético. Após verificar o pH (7,0) o meio foi autoclavado durante 15 min, a uma temperatura de 121°C e 1 atm.

A solução com carboidratos foi preparada separadamente do meio básico, foi utilizado 5 g do substrato específico para 10 ml de água destilada, a solução de carboidrato foi esterilizada através do uso de filtros de membrana e adicionada assepticamente ao meio básico antes do plaqueamento. Os carboidratos utilizados nos ensaios foram celobiose, frutose, galactose, lactose, manose, rafinose, xilose e salicilina.

A visualização da formação de ácidos (reação positiva) se dá através da mudança de cor do meio, alterando a coloração do violeta para o amarelo.

4.5 Resistência dos isolados de bactérias aos antibióticos

Para identificar os isolados resistentes aos antibióticos (Estreptomicina, Cloranfenicol, Vancomicina e Ácido nalidíxico), foi utilizado o teste proposto por Bayer e Kirby (1966) em que é adicionado um disco-difusão em ágar.

Foram utilizados discos de papel-filtro saturado com os antibacterianos descritos acima, na concentração de 30 mg, os discos foram inseridos sobre a placa com os inóculos bacterianos com aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/ml em meio Ágar R2A (descrito acima).

As placas foram incubadas entre 16 e 24 horas na temperatura de 30 °C. Os halos de inibição do crescimento bacteriano foram mensurados e os isolados testados classificados em dois grupos: resistentes (R) e sensíveis (S). No caso de bactérias sensíveis foram separadas nos quais ação do antibiótico foi bacteriostática (S^b), ou seja, que inibi o crescimento da bactéria, mas não tem ação bactericida (FERRARO, 2000).

4.6 Caracterização molecular dos isolados de bactérias

A caracterização molecular das linhagens se deu nas seguintes etapas: extração do DNA genômico, amplificação do gene RNAr 16S através da técnica de PCR, purificação dos produtos de PCR, sequenciamento do gene RNAr 16S e análise da sequência utilizando ferramentas de bioinformática.

Inicialmente as linhagens foram inoculadas em 10 ml de caldo NB/100 (mesma composição já citada, apenas sem adição de ágar) entre 2 e 6 dias a uma temperatura de 37°C. As culturas foram centrifugadas a 12000 rpm por 2 minutos, as células bacterianas foram ressuspensas em água Milli-Q e congeladas a -20°C.

Para a extração do DNA genômicos foi utilizado o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) conforme instruído pelo fabricante. A pureza e concentração de DNA extraído foi determinada utilizando um NanoDrop, modelo ND-1000 Uv/Vis.

Foram selecionados os isolados que apresentaram a concentração de DNA satisfatória para amplificação do gene de DNAr 16S em um aparelho termociclador (Primus, EUA). Foram utilizados: 2 µl do *primer* oligo 26F (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 2µl do 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-

3') na concentração de 50 pmol/μl (LANE, 1991), 200 ng de DNA genômico (5 μl) e 45 μl da solução do kit de PCR Master Mix (Promega), seguindo as indicações do fabricante. A amplificação do gene RNAr 16S se deu nas seguintes condições: temperatura de desnaturação inicial a 94°C; 25 ciclos: 94°C por um minuto, 57°C por dois minutos e 72°C por dois minutos; extensão final a 72°C por 10 minutos.

Foi realizado a eletroforese dos produtos de PCR em mini-gel de agarose utilizando 3 μl do tampão de corrida, 1 μl de GelRed™ (Biotium) e 5 μl do DNA amplificado na voltagem de 80 volts, verificando a presença da banda de 1500 pb que corresponde ao gene de RNAr 16S utilizando o marcador molecular de 100 pb (Ludwig Biotec).

A purificação dos produtos de PCR foi feita utilizando o kit de purificação Kit PCR Purification – 100 Prep. (Ludwig Biotec), seguindo as indicações do fabricante. A concentração e pureza sendo verificadas com auxílio de um NanoDrop, modelo ND-1000 Uv/Vis.

As amostras amplificadas das linhagens foram sequenciadas utilizando o *primer* 26F (5'- GAGTTTGATCMTGGCTCAG) na Plataforma de Sequenciamento da UFPE, Recife-PE, onde foi utilizado o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As sequencias obtidas foram comparas as sequências do GenBank pertencente ao National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando o BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool), disponível no site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), utilizando sequencias de RNA como referência, assumindo que apenas foram consideradas as sequências que apresentam similaridade $\geq 97\%$.

Para o alinhamento das sequência foi utilizado o software ClustalW. Seguindo o método de construção de árvore filogenética com o máximo de parcimônia, bootstrap de 1000 e o modelo Kimura 2-parâmetros. O arquivo *fasta* com as sequências desejadas foi aberto no software MEGA X 10.1 (KUMAR et al., 2018) e a construção da árvore filogenética foi realizada utilizando o método neighbour -joining.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Crescimento de bactérias em diferentes condições de cultivo

Os isolados de bactérias analisados nesse estudo foram provenientes de uma coleção de bactérias obtidas por Coutinho (2001) do solo livre de raízes, solo rizosférico e rizoplano de uma gramínea *A. adscensionis* da pastagem nativa da região de São João do Cariri, Paraíba. Para este trabalho foi feito o cultivo de 44 isolados de bactérias do gênero *Bacillus* da coleção a partir do estoque de bactérias, dos quais foi possível obter as culturas com crescimento bom dos 36 isolados, sendo esses analisados neste trabalho. Os isolados foram provenientes do solo livre de raízes (6), solo rizosférico (15) e rizoplano (15) de *A. adscensionis*.

Os isolados foram testados com relação ao crescimento em meios de cultivo com baixa (NB/100, ágar nutriente 100 vezes diluído) e alta concentração de nutrientes (NB e NB/10, ágar nutriente e ágar nutriente 10 vezes diluído, respectivamente), bem como no meio de cultivo com elevada concentração de NaCl (10%). Todos os isolados cresceram no meio NB/100.

Todos os isolados de solo (Tabela 1) apresentaram um crescimento bastante expressivo nos meios NB, NB/10 e NB/100. Em relação ao meio com concentração de 10% de NaCl, apenas um dos isolados (T2S6) apresentou crescimento, demonstrando a sensibilidade desses organismos ao crescimento em ambientes salinos.

Tabela 1 – Crescimento de isolados de bactérias do solo livre de raízes de *A. adscensionis* em diferentes meios de cultura.

Isolados	Crescimento em diferentes meios de cultura		
	NB/10x	NB/100x	10% NaCl
T2S1	+	+	-
T2S2	+	+	-
T2S3	+	+	-
T2S4	+	+	-
T2S5	+	+	-
T2S6	+	+	+

Fonte: Autor próprio, 2020.

Em relação aos isolados da rizosfera (solo rizosférico e rizoplano), todos as linhagens apresentam um desenvolvimento bastante expressivo nos meios analisados, com exceção do isolado (T2R26) que obteve um crescimento fraco nos meios NB/10 e NB/100 (Tabelas 2 e 3).

Em relação ao meio salino apenas 3 isolados do solo rizosférico e 2 do rizoplano cresceram em meio com 10% de NaCl (Tabelas 2 e 3).

Os dados obtidos mostraram que todos os isolados foram capazes de crescer tanto nos meios com baixa quantidade de nutrientes (NB/100 e NB/10) como no meio rico de nutrientes (NB), apresentando assim sua adaptação para condições oligotróficas e ambientes ricos em nutrientes. Os solos da caatinga geralmente apresentam baixa quantidade de matéria orgânica disponível para os microrganismos, caracterizando um ambiente oligotrófico. Essas condições selecionam as bactérias a se adaptarem a estes fatores, logo mesmo em habitats com alta disponibilidade de nutrientes como a rizosfera, as bactérias tendem a manter a capacidade de crescer em meios com baixa quantidade de nutrientes.

Tabela 2 - Crescimento de isolados de bactérias do solo rizosférico de *A. adscensionis* em diferentes meios de cultura.

Isolados	Crescimento em diferentes meios de cultura		
	NB/10x	NB/100x	10% NaCl
T2R1	+	+	-
T2R2	+	+	-
T2R3	+	+	-
T2R10	+	+	-
T2R11	+	+	-
T2R12	+	+	-
T2R13	+	+	-
T2R14	+	+	+
T2R15	+	+	-
T2R16	+	+	-
T2R17	+	+	-
T2R18	+	+	-
T2R19	+	+	-
T2R24	+	+	+
T2R26	+/-	+/-	+

Fonte: Autor próprio, 2020.

Tabela 3 – Crescimento de isolados de bactérias do rizoplano de *A. adscensionis* em diferentes meios de cultura.

Isolados	Crescimento em diferentes meios de cultura		
	NB/10x	NB/100x	10% NaCl
T2RP1	+	+	-
T2RP2	+	+	-
T2RP3	+	+	-
T2RP4	+	+	+
T2RP5	+	+	-
T2RP6	+	+	-
T2RP7	+	+	-
T2RP8	+	+	-
T2RP10	+	+	-
T2RP11	+	+	-
T2RP17	+	+	-
T2RP18	+	+	+
T2RP19	+	+	-
T2RP20	+	+	-
T2RP21	+	+	-

Fonte: Autor próprio, 2020.

O método convencional relacionado ao cultivo de bactérias em meios ricos em nutrientes limita a explorações e descobertas de possíveis organismos oligotróficos como os utilizados do presente estudo.

Huang & Shen (2016) em seu trabalho isolaram bactérias do solo não rizosférico em diferentes ambientes como: beiras de estrada, baías, praias e pântanos em Taiwan. Utilizaram ágar nutritivo diluído em 1000x e obtiveram um total de 74 espécies pertencentes aos filos Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria. Esses dados sugerem que o uso de meios pobres em nutrientes pode ser ótimo meio para melhor avaliação da biodiversidade de microrganismos oligotróficos dos ambientes.

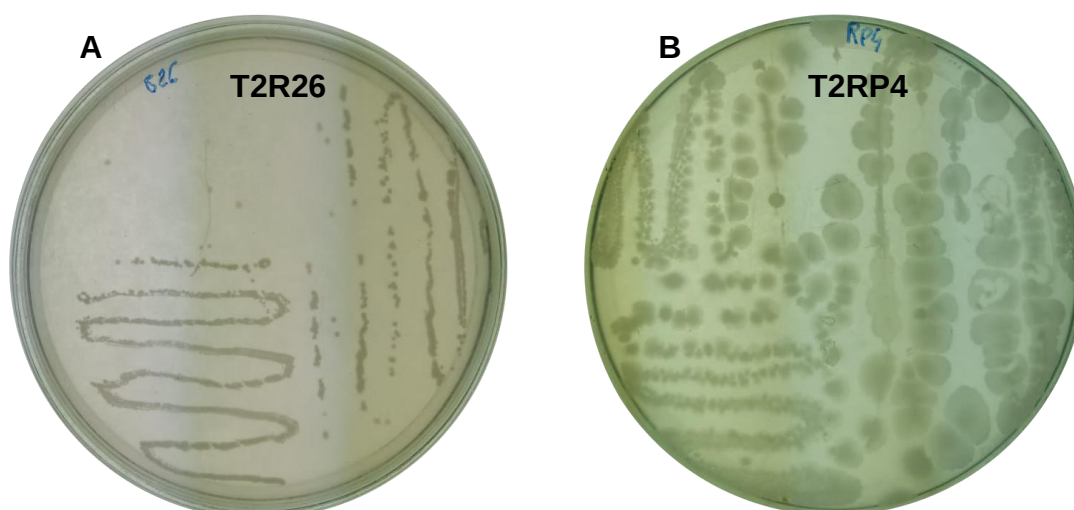


Figura 3 – Crescimento de isolados T2R26 (A) e T2RP4 (B) no meio NB/100. Crescimento: fraco (A); forte (B).

Fonte: Autor próprio, 2020.

Sugimoto et al. (1990) avaliaram a diversidade biológica de um solo rizosférico oligotrófico, utilizando o meio KB 250x diluído e um meio ágar nutriente para isolar a comunidade microbiana da rizosfera. Os autores obtiveram uma maior diversidade de rizobactérias no meio diluído, demonstrando a eficiência destes meios para captação de biodiversidade em habitats pobres em nutrientes.

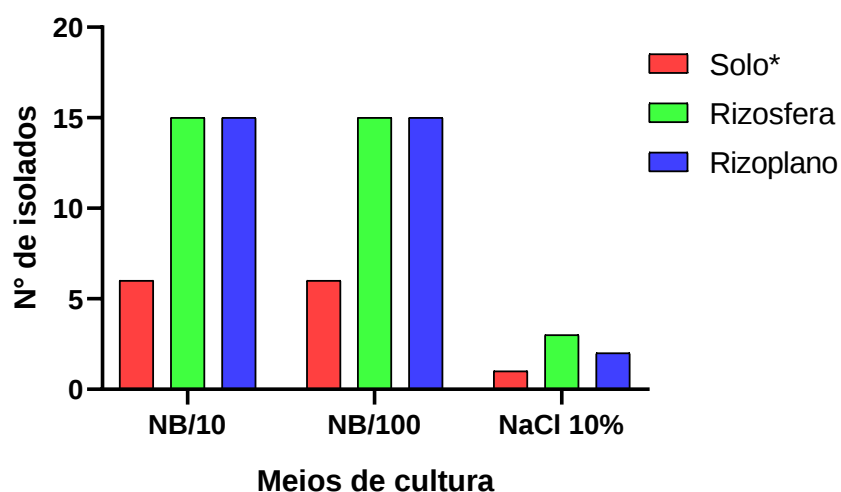


Figura 4 - Crescimento de isolados de bactérias em diferentes meios de cultura.

Fonte: Autor próprio, 2020.

É possível observar que todos os isolados independente do micro-habitat (solo, rizosfera e rizoplano) obtiveram crescimento em meio oligotrófico, já em relação ao

meio salino, uma minoria de 16,6% das bactérias apresentou características de halotolerância, devido ao seu ótimo crescimento ao meio a que foi exposta.

A temperatura é um dos principais fatores limitantes para o desenvolvimento da microbiota de solo, sendo assim, tomando como base para estipular a termotolerância dos isolados os valores de temperaturas mínima (T_{min}), ótima (T_o) e máxima (T_{max}) sugeridas por Madigan et al. (2016) e Soonleitner (1983), onde o T_{min} é $\geq 30^{\circ}\text{C}$, o T_o entre $45\text{-}55^{\circ}\text{C}$ e $T_{max} \leq 55^{\circ}\text{C}$.

Os isolados analisados nesse estudo apresentaram bom crescimento entre as temperaturas de 40 e 65°C , sendo está a melhor faixa para o desenvolvimento dos isolados (Figura 4) (Coutinho, 2001). Sete isolados (T2R1, T2R2, T2R11, T2R12, T2R13 T2R15 e T2RP11) da rizosfera demonstraram crescimento até 70°C e uma das linhagens (T2R24) mostrou o crescimento fraco em temperatura máxima de 75°C (Coutinho, 2001).

Também se nota a capacidade de crescimento em temperaturas de 30°C para todos os isolados, com exceção de dois (T2S3 e T2S5) (Coutinho, 2001), que mesmo demonstrando crescimento fraco, conseguiram se desenvolver em temperaturas de 25°C , menores que classificação do $T_{min} \geq 30^{\circ}\text{C}$ para as bactérias termofílicas.

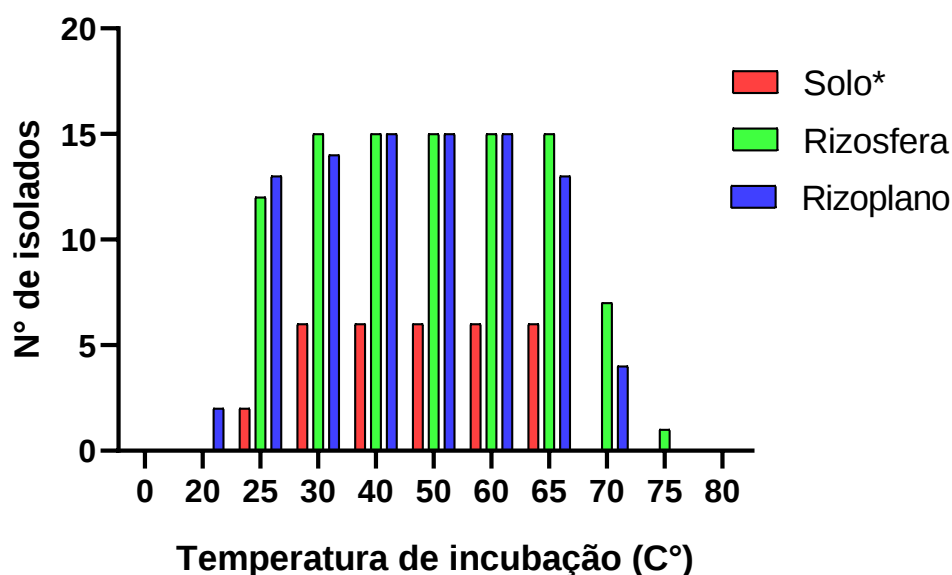


Figura 5 - Crescimento de isolados de bactérias em diferentes temperaturas de incubação.

Fonte: Autor próprio, 2020; Coutinho, 2001.

As cepas que apresentam maior tolerância a variedade de temperatura são T2R24 que cresceu em uma faixa de 25 a 75°C e T2RP11 que expressou crescimento entre 20 e 70°C. Todos os dados analisados no estudo corroboram com a ideia exposta na hipótese, que debatem a respeito dos graus de termotolerância dos isolados mensurados, que crescem em temperaturas abaixo do $T_{min} \geq 30^{\circ}\text{C}$, e acima $T_{max} \leq 55^{\circ}\text{C}$ como é visto na Figura 4.

Com base nos estudos de Rolli et al. (2015), o solo sem raízes é um ambiente mais propício a sofrer com alterações naturais ou antrópicas. A exposição do mesmo a irradiação solar faz com que ele demonstre uma variável de temperatura muito alta. Apresenta pico de temperatura em torno de meio dia, e muitas vezes esse solo permanece aquecido durante o período noturno.

Mesmo as linhagens de rizosfera demonstrando uma tolerância de até 10°C (75°C) a mais em relação a temperatura limite dos isolados de solo (65°C). Há uma enorme proximidade genética entre as espécies, a partir da relação que bactérias rizosféricas em algum momento foram linhagens de solo, atraídas pelos exsudatos liberados pela vegetação local. Logo, boa parte das características adquiridas pela comunidade da rizosfera se deu após especiação e adaptabilidade as novas condições apresentadas no micro-habitat (BARRET et al, 2011).

5.2 Atividade enzimática dos isolados de bactérias

5.2.1 ATIVIDADE PECTINOLÍTICA

Os dados da atividade pectinolítica dos isolados bacterianos são mostrados nas Tabelas 7-9.

Os isolados de bactérias provenientes do solo livre de raízes não apresentaram atividade pectinolítica (Tabela 4).

Entretanto, 20% dos isolados do solo rizosférico produziram enzimas pectinolíticas em pH 5 e 8 (Tabela 5). Os isolados mais ativos que apresentaram maior zona de hidrólise de pectina hidrolase (pH 5) foram: T2R3 (35 mm) e de pectina liase (pH 8) T2R11 (25 mm).

Entre todos os micro-habitats, o rizoplane demonstrou maior porcentagem de isolados com atividade pectinolítica, correspondendo a 53% dos isolados que produziram pectina liase (pH 8) (Tabela 6). O isolado T2RP4 apresentou a maior zona

de hidrolise de pectina (32 mm) entre os isolados do rizoplano. A proporção de bactérias que expressão atividade para a pectinase liase, em pH 5, se assemelha ao observado nos isolados de rizosfera e rizoplano (Tabela 8-9).

Tabela 4 – Atividade pectinolítica de isolados de bactérias do solo livre de raízes da pastagem de *A. adscensionis*.

Isolados	Pectina	Pectina
	hidrolase (pH 5)	liase (pH 8)
Zona de hidrolise (mm)		
T2S1	0	0
T2S2	0	0
T2S3	0	0
T2S4	0	0
T2S5	0	0
T2S6	0	0

Fonte: Autor próprio, 2020.

Tabela 5 – Atividade pectinolítica de isolados de bactérias do solo rizosférico de *A. adscensionis*.

Isolados	Pectina	Pectina
	hidrolase (pH 5)	liase (pH 8)
Zona de hidrolise (mm)		
T2R1	0	0
T2R2	0	0
T2R3	35	0
T2R10	0	0
T2R11	25	25
T2R12	0	0
T2R13	0	0
T2R14	0	0
T2R15	0	0
T2R16	0	0
T2R17	0	24
T2R18	0	0
T2R19	0	0
T2R24	16	16,5
T2R26	0	0

Fonte: Autor próprio, 2020.

Tabela 6 – Atividade pectinolítica de isolados de bactérias do rizoplano de *A. adscensionis*.

Isolados	Pectina	Pectina
	hidrolase (pH 5)	liase (pH 8)
Zona de hidrolise (mm)		
T2RP1	0	0
T2RP2	0	0
T2RP3	0	0
T2RP4	0	32
T2RP5	0	0
T2RP6	0	0
T2RP7	15	12
T2RP8	0	0
T2RP10	0	0
T2RP11	0	14,5
T2RP17	0	12
T2RP18	0	26
T2RP19	0	25
T2RP20	24	27
T2RP21	17	16,5

Fonte: Autor próprio, 2020.

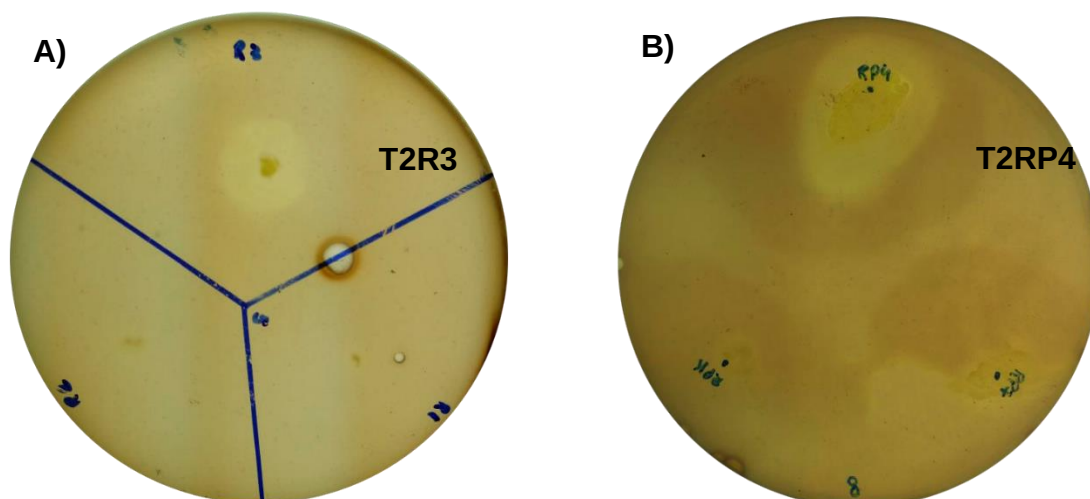


Figura 6 – Atividade pectinolítica dos isolados T2R3 (A – pectina hidrolase, pH 5,0) e T2RP4 (B – pectina liase, pH 8,0).

Fonte: Autor próprio, 2020.

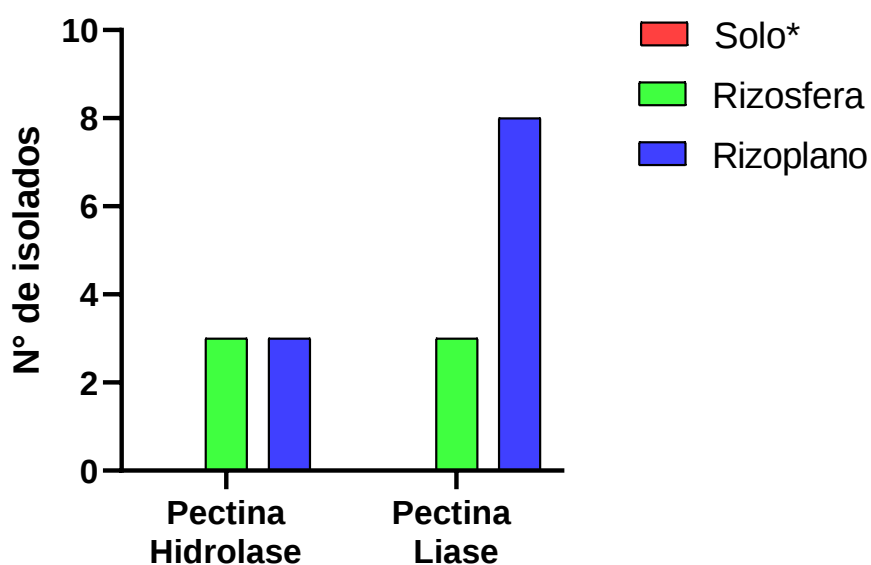


Figura 7 – Número de isolados do solo livre de raízes, solo rizosférico e rizoplano com atividade pectinolítica.

Fonte: Autor próprio, 2020.

Existem poucos estudos sobre produção de pectinases por bactérias dos ambientes áridos. Os autores como Egamberdiyeva & Höflich (2004) e posteriormente Egamberdiyeva (2005) registraram atividade pectinolítica em rizobactérias classificadas como *B. amyloliquefaciens* e *B. laevolacticus* promotoras de crescimento de plantas, em um região semiárida do Uzbequistão.

Torimiro & Okonji (2013), testaram para três espécies (*B. stearrowthermophilus*, *B. cereus* e *B. subtilis*) a atividade pectinolítica em diferentes temperaturas e pHs. Para o *B. stearrowthermophilus* o melhor pico de atividade enzimática se deu a 60°C. Já, *B. cereus* e *B. subtilis* obtiveram maior produção de enzimas pectinolíticas a 50°C. Todas as três espécies demonstraram atividades ótimas de pectinase em pH 7,5, 8 e 9. A faixa de temperatura para as espécies de *B. cereus* e *B. subtilis* e o pH 8, corrobora com os dados obtidos no presente estudo.

Mohandas et al. (2018) verificou que para *B. soronesis*, bactéria isolada a partir de frutas e legumes em decomposição, a capacidade de produção potencializada de pectinase se relaciona a três fatores principais: pH 8, concentração da massa de MgSO₄ = 0,75% e pectina a 15%. Já no trabalho produzido Roosdiana et al. (2013) foi visto que o melhor pico de atividade pectinolítica para *B. firmus* se deu a temperatura de 50°C e pH 7.

É notável a relação de pH e temperatura com atividade pectinolítica. De fato, é perceptível que na maioria dos estudos os ensaios produzidos em pH mais ácido não se obtém a mesma produtividade que em valores neutros ou mais alcalinos.

5.2.2 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA

Todos os isolados testados apresentaram atividade proteolítica e a maioria dos isolados atividade lipolítica (Tabelas 7-9).

Entre os isolados do solo livre de raízes o T2S5 foi a que demonstrou maior zona de hidrolise de caseína (38 mm) (Tabela 7).

Com relação a atividade lipolítica dos isolados do solo livre de raízes, foi observado que 66% dos isolados apresentaram produção de lipases em 37°C e 50% em 50°C (Tabelas 7-9). O isolado T2S1 demonstrou maior atividade lipolítica indicada pela maior intensidade de fluorescência em ambas as temperaturas (Tabela 7).

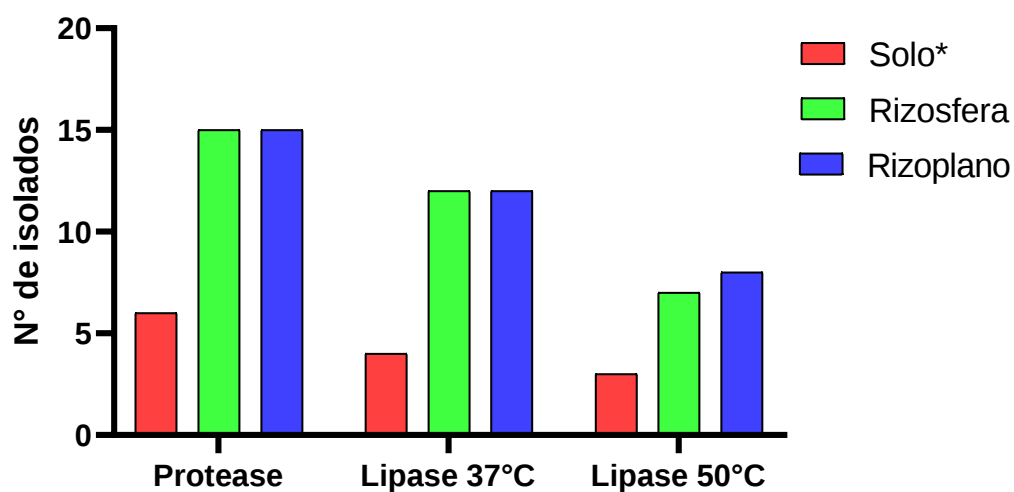


Figura 8 – Número de isolados de solo livre de raízes, solo rizosférico e rizoplano com atividade proteolítica e lipolítica.

Fonte: Autor próprio, 2020.

Tabela 7 – Atividade proteolítica e lipolítica de isolados de bactérias do solo livre de raízes da pastagem de *A. adscensionis*.

Isolados	Protease	Lipase ^{37°C}	Lipase ^{50°C}
	(Zona de hidrólise mm)		
T2S1	38	+++	++
T2S2	10	+	-
T2S3	12	+	+
T2S4	13	+	+
T2S5	45	-	-
T2S6	23	-	-

Fonte: Autor próprio, 2020.

Tabela 8 – Atividade proteolítica e lipolítica de isolados de bactérias do solo rizosférico de *A. adscensionis*.

Isolados	Protease	Lipase ^{37°C}	Lipase ^{50°C}
	Zona de hidrólise (mm)		
T2R1	25	-	-
T2R2	40	+	+
T2R3	12	+++	+++
T2R10	40	+++	+
T2R11	20	+	-
T2R12	14	+	+
T2R13	20	+++	+
T2R14	16	+++	+++
T2R15	12	-	-
T2R16	10	+	-
T2R17	13	+	-
T2R18	14	+	+
T2R19	14	+	-
T2R24	18	-	-
T2R26	24	+	-

Fonte: Autor próprio, 2020.

Entre os isolados do solo rizosférico T2R2 e T2R10 se destacaram na produção de proteases (Tabela 8).

Com relação as lipases, 80% dos isolados apresentaram atividade em 37°C, e 46,6% em 50°C, as cepas que demonstraram maior atividade em ambas temperaturas foram T2R3 e T2R14 (Tabela 8).

Entre os isolados do rizoplano T2RP1, T2RP2 e T2RP19 foram os mais ativos na degradação de caseína com halos de hidrólise de 45 mm (Tabela 9). A produção de lipases em 37°C foi observada em 80% dos isolados e em 50°C em 53,3%, sendo que o isolado T2RP1 expressou maior atividade lipolítica em ambas temperaturas.

Para todas as enzimas testadas nesse estudo o rizoplano foi o micro-habitat com maior número de isolados que expressaram atividade de enzimas extracelulares.

Tabela 9 – Atividade proteolítica e lipolítica de isolados de bactérias do rizoplano de *A. adscensionis*.

Isolados	Protease	Lipase ^{37°C}	Lipase ^{50°C}
	Zona de hidrólise (mm)		
T2RP1	45	+++	++
T2RP2	45	+	+
T2RP3	10	+	-
T2RP4	24	+++	-
T2RP5	10	+	-
T2RP6	10	+	+
T2RP7	11	+	-
T2RP8	25	+	-
T2RP10	14	+	+
T2RP11	15	+	+
T2RP17	18	+++	+
T2RP18	34	+	+
T2RP19	45	+++	+
T2RP20	15	-	-
T2RP21	28	-	-

Fonte: Autor próprio, 2020.

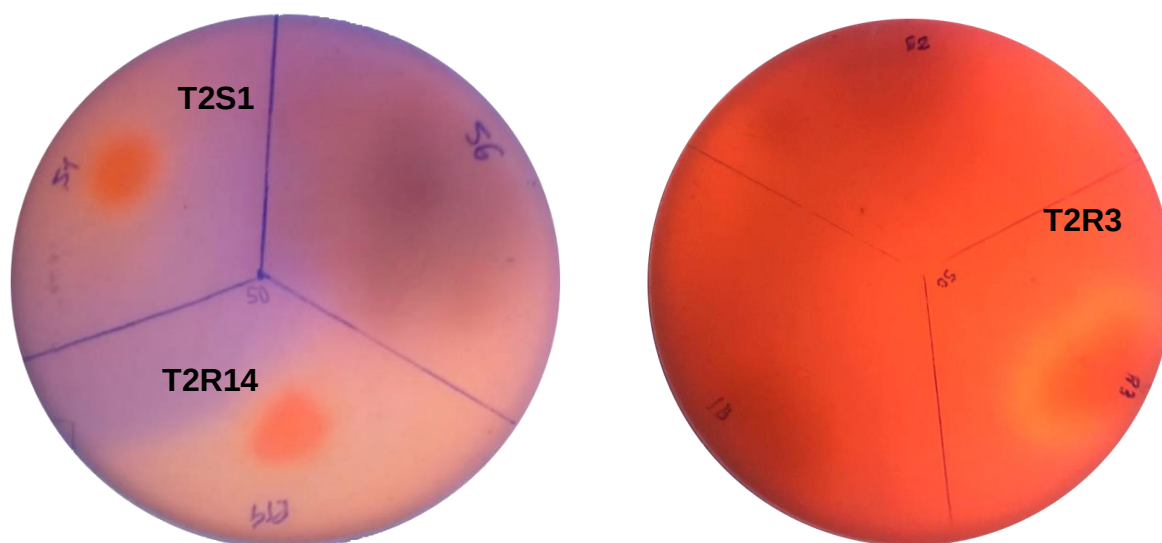


Figura 9 – Isolados de bactérias lipolíticas (A: T2S1 e T2R14; B: T2R3) em meio de cultura com óleo vegetal residual e Rodamina B. As colônias positivas exibem a fluorescência sob irradiação da luz UV. Fonte: Próprio autor, 2020.

Devido alta capacidade dos isolados analisados para produção de enzimas, os trabalhos futuros e mais detalhados, podem revelar possíveis aplicações dessas enzimas. O fato que todos os isolados estudados neste trabalho produziram proteases é promissor, principalmente devido o potencial de aplicação e bioprospecção dessas enzimas para a indústria.

A utilização da produção de proteases através dos métodos enzimáticos bacterianos é menos agressiva ao meio ambiente do que o processo químico, além do enorme potencial para o mercado de enzimas e aplicação industrial (SINGHAL et al., 2012). Por exemplo, Uddin et al. (2017) isolou uma protease termotolerante de um *B. subtilis* com aplicação no processamento de couro e detergentes. A descoberta de novas espécies produtoras de proteases é essencial para o estabelecimento de uma vasta lista de possíveis enzimas com ampla utilidade na indústria. Como a protease alcalina termoestável de *Anoxybacillus* sp. purificada por Bekler et al. (2015), esta que possui atividade máxima na temperatura de 50°C a pH 9. Ou mesmo isolados de *B. cereus* tolerantes a solventes orgânicos capazes de produzir proteases com atividade ótima a 60°C (GHORBEL et al., 2003).

O potencial de uso dos isolados analisados para produção de lipases também é alto, já que 77,7% dos isolados em 37°C e 50% em 50°C demonstraram atividade. Alguns dos isolados como T2S1, T2R3, T2R10 e T2RP1 demonstram forte atividade

lipolítica em temperatura 50°C, mostrando sua tolerância a temperaturas elevadas, que pode ser um fator determinante para o uso das mesmas em pesquisas com finalidades biotecnológicas.

Estudos como o de Gaur et al (2012) que isolou um *Bacillus sp.* de regiões semiáridas no Rajastão com melhor atividade lipolítica em temperaturas de 60°C e pH 8. Ou o trabalho Ugras (2017) que isolou e produziu uma cepa de *B. licheniformis* capaz de produzir lipases eficientes a um temperatura de 90°C e pH 9. Corroboram com o potencial das enzimas termotolerantes no uso industrial.

Outros gêneros como *Anoxybacillus* são potenciais produtores de lipases termotolerantes. Como é visto no estudo produzido por Burcu Bakir & Metin (2017), que isolou uma bactéria, classificada posteriormente como *Anoxybacillus sp.* HBB16, com taxas de crescimento e produção de lipases a 50°C e pH 6,5. No mesmo estudo, foi verificado que o cultivo do isolado a uma velocidade de 180 rpm, potencializa a atividade enzimática a uma temperatura de 55°C e pH 9,5, sendo este um salto discrepante de uma condição ácida para uma alcalina. Sahoo et al. (2020) verificou a eficiência da lipase produzida pelo isolado *Anoxybacillus sp.* ARS-1 na indústria de detergentes, em que foi aferido uma atividade ótima a temperatura de 57,7 °C e pH 8,31 e resistência a maioria dos detergentes químicos e comuns utilizados no estudo.

5.3 Consumo de carboidratos como fonte de carbono

Os dados de uso de carboidratos como fonte de carbono por isolados de bactérias mostram as Tabelas 13 - 15.

Entre os isolados do solo (Tabela 10) foi observado que T2S2, T2S3, T2S4 e T2S5 utilizaram a maioria dos açúcares testados, ou seja, galactose, lactose, manose, rafinose e xilose como fonte de carbono. Já os isolados T2S1 e T2S6 não utilizaram nenhum dos carboidratos.

Tabela 10 – Uso de carboidratos como fonte de carbono por isolados de bactérias do solo.

Isolados	Carboidratos							
	Cel	Fru	Gal	Lac	Man	Raf	Xil	Sal
T2S1	-	-	-	-	-	-	-	-
T2S2	-	-	+	+	+	+	+	-
T2S3	-	-	+	+	+	+	+	-
T2S4	-	-	+	+	+	+	+	-
T2S5	-	-	+	+	+	+	+	-
T2S6	-	-	-	-	-	-	-	-

Cel= Celobiose; **Fru**= Frutose; **Gal**= Galactose; **Lac**= Lactose; **Man**= Manose; **Raf**= Rafinose; **Xil**= Xilose e **Sal**= Salicilina.

Fonte: Autor próprio, 2020; Grudzinska, 2005.

O consumo dos carboidratos na rizosfera (Tabela 11) não se torna mais expressivo, sendo assim, mais da metade dos isolados, cerca de 55,3% não utilizou nenhum dos substratos dispostos, 33,3% usufruiu de frutose, galactose, lactose, manose, rafinose e xilose como fonte de carbono, entre eles a cepa T2R16 consumiu os carboidratos já citados anteriormente com exceção da frutose, este que foi o único aproveitado pelo isolado T2R1. Celobiose e salicilina novamente não foram utilizados como fonte de carbono.

Tabela 11 – Uso de carboidratos como fonte de carbono por isolados de bactérias do solo rizosférico de *A. adscensionis*.

Isolados	Carboidratos							
	Cel	Fru	Gal	Lac	Man	Raf	Xil	Sal
T2R1	-	+	-	-	-	-	-	-
T2R2	-	-	-	-	-	-	-	-
T2R3	-	-	-	-	-	-	-	-
T2R10	-	-	-	-	-	-	-	-
T2R11	-	+	+	+	+	+	+	-
T2R12	-	+	+	+	+	+	+	-
T2R13	-	+	+	+	+	+	+	-
T2R14	-	-	-	-	-	-	-	-
T2R15	-	-	-	-	-	-	-	-
T2R16	-	-	+	+	+	+	+	-
T2R17	-	-	-	-	-	-	-	-
T2R18	-	+	+	+	+	+	+	-
T2R19	-	+	+	+	+	+	+	-
T2R24	-	-	-	-	-	-	-	-
T2R26	-	-	-	-	-	-	-	-

Cel= Celobiose; Fru= Frutose; Gal= Galactose; Lac= Lactose; Man= Manose; Raf= Rafinose; Xil= Xilose e Sal= Salicilina.

Fonte: Autor próprio, 2020; Grudzinska, 2005.

Quando direcionamentos a capacidade de consumo de carboidratos e relacionamos aos dados obtidos com a comunidade do rizoplane (Tabela 12) podemos observar que o aproveitamento dessas biomoléculas é superior ao que foi constatado nos dois micro-habitats anteriores (solo e rizosfera). De modo que, 60% dos isolados utilizada algum dos substratos para obtenção de carbono em contraste aos 40% que não se beneficia de nenhum deles. Em virtude disso, destacam-se as cepas T2RP8, T2RP19 e T2RP20 por usufruir de todos os carboidratos com exceção da salicilina. Além disso, os únicos consumidores de celobiose foram as linhagens citadas anteriormente e o isolado T2RP10.

Tabela 12 – Uso de carboidratos como fonte de carbono por isolados de bactérias do rizoplano de *A. adscensionis*.

Isolados	Carboidratos							
	Cel	Fru	Gal	Lac	Man	Raf	Xil	Sal
T2RP1	-	+	-	-	-	+	+	-
T2RP2	-	+	-	-	-	+	+	-
T2RP3	-	+	+	+	+	+	+	-
T2RP4	-	-	-	-	-	-	-	-
T2RP5	-	+	-	-	-	+	+	-
T2RP6	-	+	+	+	+	+	+	-
T2RP7	-	-	-	-	-	-	-	-
T2RP8	+	+	+	+	+	+	+	-
T2RP10	+	+	-	-	-	+	+	-
T2RP11	-	-	-	-	-	-	-	-
T2RP17	-	-	-	-	-	-	-	-
T2RP18	-	-	-	-	-	-	-	-
T2RP19	+	+	+	+	+	+	+	-
T2RP20	+	+	+	+	+	+	+	-
T2RP21	-	-	-	-	-	-	-	-

Cel= Celobiose; Fru= Frutose; Gal= Galactose; Lac= Lactose; Man= Manose; Raf= Rafinose; Xil= Xilose e Sal= Salicilina.

Fonte: Autor próprio, 2020; Grudzinska, 2005.

A maioria das bactérias podem utilizar seletivamente diversos substratos para obtenção de carbono, como os carboidratos. A presença de diferentes fontes de carbono preferíveis aquele organismos impede a expressão de sistemas catabólicos que permitam o uso de substratos secundários. Esse mecanismo é conhecido como CCR ou repressão ao catabólico secundário, este que regula a expressão de genes necessários para a utilização dessas fontes secundárias (GORKE & STÜLKE, 2008). A CCR pode agir limitando a captação e utilização de carboidratos, regulando-se nas capacidades metabólicas da bactéria. Muito da escolha do carboidrato como fonte de carbono é feita por indução específica do açúcar. E mesmo em situações que apenas uma fonte de carboidrato esteja disponível a CRC continua agindo regulando e

limitando o consumo interno de carboidratos das bactérias (BRÜCKNER & TITGEMEYER, 2002).

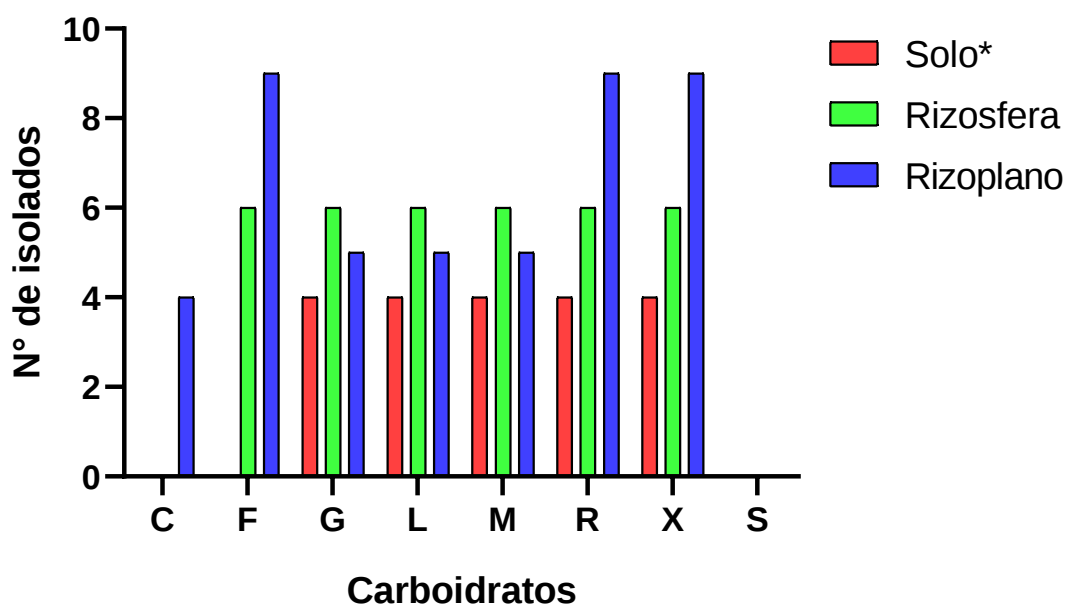


Figura 10 – Número de isolados de solo livre de raízes, solo rizosferico e rizoplano com atividade proteolítica e lipolítica capazes de usar os carboidratos como fonte de carbono. C= Celobiose; F= Frutose; G= Galactose; L= Lactose; M= Manose; R= Rafinose; X= Xilose e S= Salicilina.

Fonte: Autor próprio, 2020; Grudzinska, 2005.

A capacidade das linhagens em todos os micro-habitats de usufruir dos carboidratos como fonte de carbono é diminuta. O consumo de celobiose só foi registrado em isolados do rizoplano, representando apenas 11,1% para todas as linhagens do estudo. Para frutose, galactose, lactose e manose, esses valores sobem para 41,5%, sendo os número mais expressivos para rafinose e xilose, equivalendo a um total de 52,2% de todos os isolados. Em virtude disso estimasse a não necessidade do gasto energético com essa rota alternativa de obtenção de carbono.

5.4 Resistência microbiana a antibióticos

A resistência microbiana é um dos fatores mais preocupantes para a sociedade, visto que o desenvolvimento de cepas hiper-resistentes se torna um problema à

medida que não existiriam antibióticos efetivos para combater os patógenos já conhecidos ou possíveis patógenos futuros (MARTÍNEZ, 2012).

Independente das linhagens utilizadas no estudo não serem classificadas como patógenos, é relevante o entendimento acerca de possíveis resistências adquiridas e quais os fatores relacionados à mesmo, por exemplo, o uso de antimicrobianos agrícolas ou mesmo transferência horizontal.

Os dados referentes aos isolados de solo (Tabela 13) mostraram uma forte sensibilidade de isolados a estreptomicina, apenas um isolado T2S4 demonstrou ser resistente. Todos os isolados foram sensíveis aos antibióticos cloranfenicol e vancomicina, no entanto, o ácido nalidíxico só foi efetivo sobre a linhagem T2S2, todos as outras sendo resistentes ao seu efeito antibactericida.

Tabela 13 – Resistência de isolados de bactérias do solo livre de raízes aos antibióticos.

Isolados	Antibióticos			
	Estreptomicina	Cloranfenicol	Vancomicina	Ác. nalidíxico
T2S1	S	S	S	R
T2S2	S	S	S	S
T2S3	S	S	S	R
T2S4	R	S	S	R
T2S5	S	S	S	R
T2S6	S	S ^(b)	S	R

Resistentes (R) e sensíveis (S) no caso de bactérias sensíveis foram separadas as quais a ação do antibiótico foi bacteriostática (S^b).

Fonte: Autor próprio, 2020; Grudzinska, 2005.

Os isolados do solo rizosférico (Tabela 14) demonstraram forte sensibilidade aos antibióticos estreptomicina, cloranfenicol e vancomicina. Em relação ao ácido nalidíxico, 66% das linhagens se mostraram resistentes, sendo o seu efeito antimicrobiano inferior aos outros antibióticos testados.

Tabela 14 – Resistência de isolados de bactérias do solo rizosférico de *A. adscensionis* aos antibióticos.

Isolados	Antibióticos			
	Estreptomicina	Cloranfenicol	Vancomicina	Ác. nalidíxico
T2R1	S	S	S	R
T2R2	S	S	S	R
T2R3	S	S	S	R
T2R10	S	S	S	S
T2R11	S	S	S	R
T2R12	S	S	S	R
T2R13	S	S	S	R
T2R14	S	S	S	R
T2R15	S	S	S	R
T2R16	S	S	S	R
T2R17	S	S	S	S
T2R18	S	S	S	S
T2R19	S	S	S	R
T2R24	S	S	S	S
T2R26	S ^(b)	S	S	S

Resistentes (R) e sensíveis (S) no caso de bactérias sensíveis foram separadas as quais a ação do antibiótico foi bacteriostática (S^b).

Fonte: Autor próprio, 2020; Grudzinska, 2005.

Os dados referentes aos isolados de rizoplano (Tabela 15) mostram maior número de isolados que exibem a resistência aos antibióticos testados. 33,3% dos isolados foram resistentes a estreptomicina, 20% a cloranfenicol, 6,6 % à vancomicina e 93,3% para ácido nalidíxico. É evidenciado a notável tolerância antimicrobiana da cepa T2RP18 que demonstrou resistência para todos os antibióticos com exceção do cloranfenicol, o qual exibiu o efeito bacteriostático.

Tabela 15 – Resistência de isolados de bactérias do rizoplane de *A. adscensionis* aos antibióticos.

Isolados	Antibióticos			
	Estreptomicina	Cloranfenicol	Vancomicina	Ác. nalidíxico
T2RP1	S	R	S	R
T2RP2	R	S	S	R
T2RP3	S	R	S	R
T2RP4	R	S	S	R
T2RP5	S	S	S	R
T2RP6	S	S	S	R
T2RP7	S	R	S	S
T2RP8	S	S	S	R
T2RP10	S	S	S	R
T2RP11	S ^(b)	S ^(b)	S	S
T2RP17	R	S ^(b)	S	R
T2RP18	R	S ^(b)	R	R
T2RP19	S	S	S	R
T2RP20	S	S	S	R
T2RP21	R	S ^(b)	S	R

Resistentes (R) e sensíveis (S) no caso de bactérias sensíveis foram separadas as quais a ação do antibiótico foi bacteriostática (S^b).

Fonte: Autor próprio, 2020; Grudzinska, 2005.

A resistência das bactérias aos antimicrobianos é multifatorial, podendo se originar através da exposição direta a antibióticos ou mesmo a resistência adquirida por transferência horizontal de genes (BJÖRKMAN et al., 2000; THOMAS & NIELSEN, 2005).

Bais et al. (2005) demonstraram a resistência adquirida através da exsudação de antimicrobianos de raízes, em que a exposição persistente das bactérias a esses exsudatos conferiu a elas resistência específica e capacidade de inibição da síntese desses antimicrobianos, permitindo assim a contaminação das raízes.

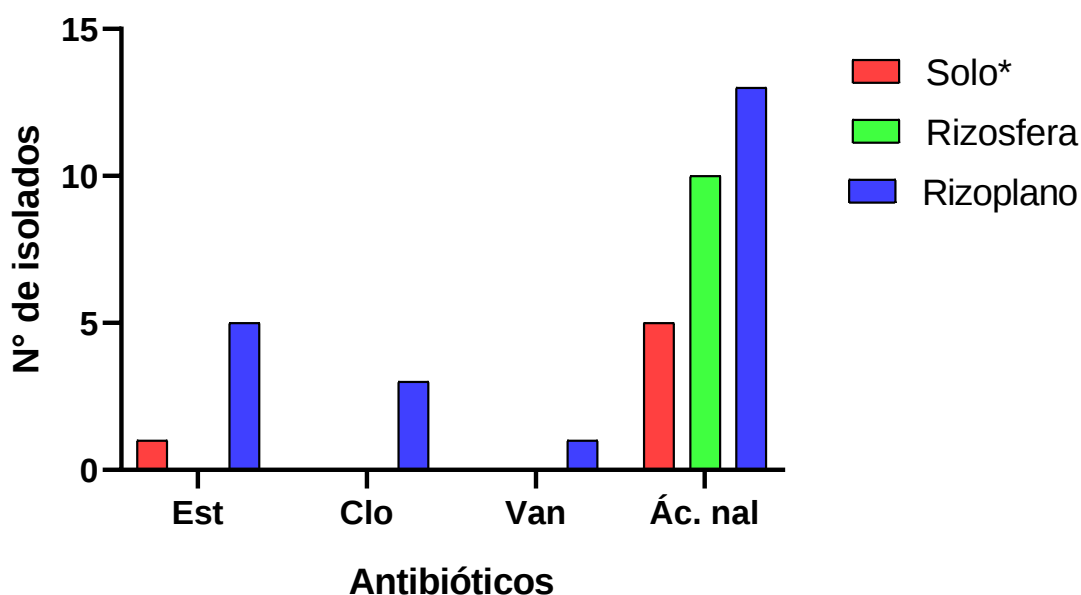


Figura 11 – Número de isolados de solo, rizosfera e rizoplano resistentes aos antibióticos estreptomicina, cloranfenicol, vancomicina e ácido nalidíxico. Est = Estreptomicina, Clo= Cloranfenicol, Van= Vancomicina e Ác. nal = Ácido nalidíxico. Fonte: Autor próprio, 2020; Grudzinska, 2005.

A maioria dos antibióticos foram efetivos contra os isolados, a proporção de resistência foi mínima, para estreptomicina apenas 16,6% dos isolados sobreviveram, para cloranfenicol somente 8,3% foram resistentes, à vancomicina foi o antibiótico mais efetivo dos quatro, apenas 2,3% dos isolados possuindo resistência, a única exceção entre os antibióticos foi o ácido nalidíxico com 77,7% dos isolados sendo resistentes. As linhagens do rizoplano foram as mais expressivas em questão de resistência aos antibióticos, a cepa T2RP18 foi a única tolerante à vancomicina.

5.5 Identificação e análise filogenética dos isolados de bactérias

Análise molecular foi realizada para oito isolados de bactérias, os quais foram submetidos a extração de DNA, amplificação e sequenciamento do gene de DNAr 16S.

Os valores de concentração de DNA obtidos variaram entre 10,0 ng/μl e 41,9 ng/μl (Tabela 16). Quanto à razão entre as absorbâncias 260/280, esta utilizada para estimar a pureza das amostras, os valores obtidos variaram entre 1,64 e 2,2.

Tabela 16 – Quantidade e pureza do DNA genômico dos isolados de bactérias do solo (T2S_), solo rizosférico (T2R_) e do rizoplane (RP_) de capim panasco (*Aristida adscencionis* L.).

Isolados	DNA (ng/μl)	260/280
T2R10	26,5	2,2
T2RP2	16,6	1,78
T2RP17	27,3	1,87
T2RP5	20	1,84
T2R14	41,9	1,88
T2R13	10,0	1,64
T2S6	10,7	1,67
T2RP6	29,7	1,83

Fonte: Autor próprio, 2020.

Os isolados de bactérias utilizadas no presente estudo haviam sido classificadas na base de características fenotípicas por Coutinho (2001) como as bactérias em forma de bastonetes, gram-positivas, aeróbias e formadoras de esporos, identificando-as como *Bacillus* spp.

Os dados obtidos na base das sequências de DNAr 16S e análise BLAST mostraram que os isolados analisados pertencem a família *Bacillaceae*, gênero *Bacillus* e *Axonybacillus* do filo Firmicutes.

Os isolados *Bacillus* spp. T2R10, T2R14, T2RP2, T2RP5, T2RP6 e T2RP17 apresentaram 97% de similaridade com as espécies *B. wiedmanni*, *B. proteolyticus*, *B. albus*, *B. cereus* e *B. paramycoides*.

Os isolados *Axonybacillus* spp. T2R13, T2RP21 e T2S6 apresentaram 97,50% de similaridade com a espécie *A. rubeus* e 97,40% com *A. geothermalis*.

Tabela 17 – Identificação dos isolados de bactérias baseada nas sequências parciais de DNAr 16S submetidos a análise BLAST.

Isolados	Alinhamento mais significativo	Código de acesso - NCBI	E-value	Id máx. %
T2R10, T2R14, T2RP2, T2RP5, T2RP6, T2RP17	<i>Bacillus wiedmannii</i>	NR_152692.1	0,0	97,00
	<i>Bacillus proteolyticus</i>	NR_157735.1	0,0	97,00
	<i>Bacillus albus</i>	NR_157729.1	0,0	97,00
	<i>Bacillus paramycoides</i>	NR_157734.1	0,0	97,00
	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1	0,0	97,00
T2S6, T2R13, T2RP21	<i>Anoxybacillus rupiensis</i>	NR_042379.1	0,0	97,50
	<i>Anoxybacillus geothermali</i>	NR_151896.1	0,0	97,40

Fonte: Autor próprio, 2020.

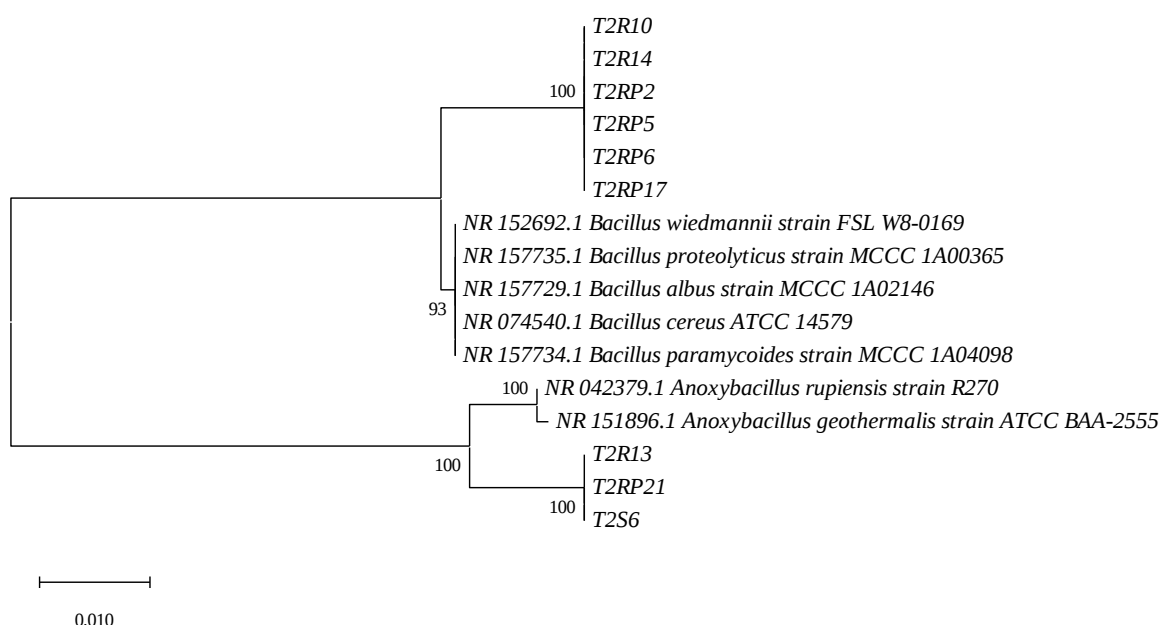


Figura 12 – Árvore filogenética de bactérias isoladas do solo (T2S_), solo rizosférico (T2R_) e do rizoplano (RP_) de *A. adscensionis* e de linhagens de bactérias do GenBank baseada na comparação das sequencias de RNAr 16S, utilizando análise neighbour-joining e o modelo Kimura 2 parâmetros. Os valores de bootstrap mostrados na árvore foram obtidos com base em 1.000 réplicas; NR _ são números de acesso das sequencias do GenBank.

Fonte: Autor próprio, 2020.

O gênero *Bacillus* é cosmopolita, deste modo, dispõe de uma ampla variedade de espécies com diferentes metabolismos susceptíveis a suportar diversas condições. Já o gênero *Anoxybacillus* é comumente encontrado em fontes termais ou em esterco de animais (ZEIGLER & PERKINS, 2008; GOH et al., 2014). A maioria dos trabalhos que registraram o gênero *Anoxybacillus* está relacionado a ambientais com temperaturas muito elevadas e condições geralmente extremas, como águas de fontes termais (DULGER et al., 2004), solos geotermiais, alguns desses encontrados na Antártica (POLI et al., 2006) ou em estrume (PIKUTA et al., 2000).

As relações filogenéticas dentro da família Bacillaceae é inconsistente, mesmo gêneros já bem estabelecidos como *Bacillus* ou *Geobacillus* ou mesmo novos gêneros como *Anoxybacillus* são polifiléticos, e a maioria de suas espécies não possuem histórias evolutivas em comum. Uma enorme problemática para classificação desses organismos é a diversidade fenotípica observada no gênero *Bacillus* que dificulta não só o estabelecimento das relações filogenéticas dentro do próprio gênero, mas também interfere nos clados dos demais gêneros pertencentes a Bacillaceae (PIKUTA et al, 2000; LIU et al., 2018; PATEL & GUPTA, 2020).

6 CONCLUSÕES

- Todos os isolados utilizados no estudo apresentaram crescimento expressivo nos meios NB, NB/10 e NB/100, ou seja, podem ser classificados como organismos oligotróficos facultativos;
- Apenas 16,6% dos isolados cresceram no meio de cultura com concentração de 10% de NaCl, demonstrando a sensibilidade desses organismos a alta salinidade;
- A maioria dos isolados foram produtores de proteases e lipases, e demonstrando potencial para futuras aplicações em pesquisas biotecnológicas;
- O rizoplano foi o único micro-habitat que apresentou maior número de isolados produtores de pectinases, cerca de 53% dos isolados produziram pectina liase;
- Entre os isolados analisados, 11% utilizaram celobiose, frutose, galactose, lactose e manose 44%, 52,2% rafinose e xilose, e 41,5% não utilizaram nenhuma fonte de açúcar testada.
- A grande maioria dos isolados apresentou sensibilidade aos antibióticos estreptomicina, cloranfenicol e vancomicina. Entretanto a maioria dos isolados foi resistente ao ácido nalidíxico.
- Nove isolados analisados na base das sequências de DNAr 16S pertencem a família *Bacillaceae*, gênero *Bacillus* (7 isolados) e *Axonybacillus* (2 isolados) do filo Firmicutes.

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, L. J. O. **Degradação do solo e desertificação no Nordeste do Brasil**. Brasília, Distrito Federal: Embrapa, 2010.
- ALI, Y. B.; VERGER, R.; ABOUSALHAM, A.. **Lipases and phospholipases**. Humana Press, 2012. p. 31 - 51.
- ALLISON, S. D. et al. Soil enzymes: linking proteomics and ecological processes. *Manual of Environmental Microbiology*, Third Edition. **American Society Of Microbiology**, p. 704-711, 2007.
- ALLISON, S. D. et al. Evolutionary-economic principles as regulators of soil enzyme production and ecosystem function. **Soil Enzymology**, Berlin, Heidelberg, p. 229-243, 2010.
- ALKORTA, I. et al. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 21-28, 1998.
- ARAÚJO, A. S. F. et al. Soil bacterial diversity in degraded and restored lands of Northeast Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 5, p. 891-899, 2014.
- ARUN, S.; MUKHOPADHYAY, M.; CHAKRABORTY, P.. **A Review on Antibiotics Consumption, Physico-Chemical Properties and Their Sources in Asian Soil**. Springer, Cham: Antibiotics And Antibiotics Resistance Genes In Soils, 2017.
- BAIS, Harsh P. et al. Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. **Nature**, v. 434, n. 7030, p. 217-221, 2005.
- BAIS, H.P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review Of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233-266, 2006.
- BHANDARI, V. et al. Molecular signatures for Bacillus species: demarcation of the Bacillus subtilis and Bacillus cereus clades in molecular terms and proposal to limit the placement of new species into the genus Bacillus. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2712-2726, 2013.
- BARBOSA, M. R. V. Vegetação e flora no Cariri Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 3, p. 313-322, 2007.
- BARRET, M.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F.. Functional genomic analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence. **Biology And Fertility Of Soils**, Berlin, v. 47, p. 729-743, 2011.
- BANERJEE, G.; RAY, A. K.. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. **Biotechnology And Genetic Engineering Reviews**, v. 33, n. 2, p. 119-143, 2017.

BAYER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am J clin pathol**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BEKLER, F. M.; ACER, Ö.; GÜVEN, K. Production and purification of novel thermostable alkaline protease from *Anoxybacillus* sp. KP1. **Cellular and Molecular Biology**, v. 61, n. 4, p. 113-120, 2015.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J; BAKKER, P. A. H. M.. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends In Plant Science**, v. 17, n. 8, p. 378-386, 2012.

BEVER, J. D.; PLATT, T. G.; MORTON., Elise R.. Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. **Annual Review Of Microbiology**, New York, v. 66, p. 265-283, 2012.

BRANDÃO, E. M. Os componentes da comunidade microbiana do solo. **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 1-15, 1992.

BRASIL. **Programa de Ação Nacional de Combate à Desertificação e Mitigação dos Efeitos da Seca/PAN-Brasil**. Brasília (DF): Ministério do Meio Ambiente/Secretaria de Recursos Hídricos, 2004. 214p.

BRÜCKNER, R.; TITGEMEYER, F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. **FEMS microbiology letters**, v. 209, n. 2, p. 141-148, 2002.

BURCU B., Z.; METIN, K. Production and characterization of an alkaline lipase from thermophilic *Anoxybacillus* sp. HBB16. **Chemical and biochemical engineering quarterly**, v. 31, n. 3, p. 303-312, 2017.

BURNS, R. G.. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 14, n. 5, p. 423-427, 1982.

BJÖRKMAN, J. et al. Efeitos do ambiente em mutações compensatórias para melhorar os custos da resistência a antibióticos. **Ciência**, v. 287, n. 5457, p. 1479-1482, 2000.

CAMPBELL, R.; GREAVES, M. P.. **Anatomy and community structure of the rhizosphere**. The Rhizosphere, 1990.

CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; PRATA, M. C.. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992.

CARDOSO, E.J.B.N. et al. PGPR in coniferous trees. In: MAHESHWARI, D.K. **Bacteria in agrobiology: crop ecosystems**. New York: Springer, 2011. p. 345-360.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 221.

CASAS-GODOY, L. et al. **Lipases: an overview**. New York: Humana Press, 2018. p. 3-38.

CAVAGLIERI, L.; ORLANDO, J.; ETCHEVERRY, M.. Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. **Microbiological Research**, Jena, v. 164, p. 391-399, 2009.

COHN, F. 1872. Untersuchungen über Bakterien. Pages 127-224 in: **Beiträge zur Biologie der Pflanzen** 1, 1875.

CONNOR, N. et al. Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 76, n. 5, p. 1349-1358, 2010.

CONTESINI, F. J. et al. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical Reviews In Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 321-334, 2018.

CORTESÃO, M. et al. *Bacillus subtilis* spore resistance to simulated Mars surface conditions. **Frontiers In Microbiology**, p. 333, 2019.

COTTA, S. R. O solo como ambiente para vida microbiana. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. São Paulo: Usp, 2016. p. 23.

COUTINHO, H. D. M.. **Diversidade e Dinâmica Populacional dos Microrganismos do Solo e da Rizosfera de Capim Panasco (*Aristida adscensionis* L.) no Semiárido Nordestino**. 126 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal da Paraíba - UFPB, João Pessoa - PB, 2001.

CLOETE, T. E.. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 277-282, 2003.

DIONISIO, F. et al. Plasmids spread very fast in heterogeneous bacterial communities. **Genetics**, v. 162, n. 4, p. 1525-1532, 2002.

DUCHICELA, J. et al. Soil aggregate stability increase is strongly related to fungal community succession along an abandoned agricultural field chronosequence in the Bolivian Altiplano. **Journal Of Applied Ecology**. p. 1266-1273. 2013.

DUNDORE-ARIAS, J. P. et al. Carbon amendments induce shifts in nutrient use, inhibitory, and resistance phenotypes among soilborne *Streptomyces*. **Frontiers In Microbiology**, v. 10, p. 498, 2019.

DULGER, S.; DEMIRBAG, Z.; BELDUZ, A. O. *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1499-1503, 2004.

EGAMBERDIYEVA, Dilfuza; HÖFLICH, Gisela. Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan. **Journal of Arid Environments**, v. 56, n. 2, p. 293-301, 2004.

EGAMBERDIYEVA, Dilfuza. Plant-growth-promoting rhizobacteria isolated from a Calcisol in a semi-arid region of Uzbekistan: biochemical characterization and

effectiveness. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 168, n. 1, p. 94-99, 2005.

FABRICANTE, J. R.; ANDRADE, L. A. Análise estrutural de um remanescente de caatinga no Seridó Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 3, p. 341-349, 2007.

FERRARO, M. J.. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. Nccls, 2000.

FIERER, N.; JACKSON, R. B.. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 103, n. 3, p. 626-631, 2006

FISCH, K. M.. Biosynthesis of natural products by microbial iterative hybrid PKS–NRPS. **Rsc Advances**, v. 3, n. 40, p. 18228-18247, 2013.

FOJAN, P. et al. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 103-1041, 2000.

GARG, G. et al. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **Biotech**, v. 6, n. 1, p. 47-47, 2016.

GIULIETTI, A. M. et al. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília, Distrito Federal: Ministério do Meio Ambiente, 2004.

GARCIA-CARREON, F. L.; TORO, M. A. N. del. Classification of proteases without tears. **Biochemical Education**, v. 25, n. 3, p. 161-167, 1997.

GAUR, D. et al. Estimation of extracellular lipase enzyme produced by thermophilic bacillus sp. isolated from arid and semi-arid region of Rajasthan, India. **Nature Precedings**, p. 1-1, 2012.

GHORBEL, B.; SELLAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M.. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 5, p. 513-518, 2003.

GOH, K. M. et al. Analysis of *Anoxybacillus* genomes from the aspects of lifestyle adaptations, prophage diversity, and carbohydrate metabolism. **PLoS One**, v. 9, n. 3, 2014.

GOMES, E. et al. Applications and benefits of thermophilic microorganisms and their enzymes for industrial biotechnology. **Gene Expression Systems In Fungi: Advancements And Applications**, Springer, Cham, p. 459-492, 2016.

GÖRKE, B.; STÜLKE, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 613-624, 2008.

GRUDZINSKA, K. **Caracterização de bactérias *Bacillus* spp. isoladas do solo do semi-árido do Nordeste do Brasil.** (Em polonês). 2005. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Biologia. Universidade Nicolaus Copernicus, Torun, Polônia, 2005.

HANKIN, L.; ZUCKER, M.; SANDS, D. C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Appl. Microbial**, v. 22, p. 205-209, 1971.

HANIF, A.; YASMEEN, A.; RAJOKA, M. I.. Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 94, n. 3, p. 311-319, 2004.

HARHOLT, J.; SUTTANGKAKUL, A.; SCHELLER, H. V. Biosynthesis of pectin. **Plant Physiology**, v. 153, n. 2, p. 84-395, 2010.

HASAN, F. et al. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HAWES, M. C.; BRIGHAM, L. A.. Impact of root border cells on microbial populations in the rhizosphere. **Adv Plant Pathol**, v. 8, p. 119-148, 1992.

HILTNER, L.. About new experiences and problems in the field of soil bacteriology with special attention to green manure and fallow land. **Arb. German Agricultural Society**, Berlin, v. 98, p. 59-78, 1904.

HOPKINS, W. G.; HUNER, N. P.. **Introduction to plant physiology**. New York: John Willey And Sons., 1995.

HUANG, P. M.; BOLLAG, J. M.. Minerals organics microorganisms interactions in the soil environment. **John Wiley And Sons Ltd**, p. 3-39, 1998.

HUANG, Yu-Shiuan; SHEN, Fo-Ting. Bioprospecting of facultatively oligotrophic bacteria from non-rhizospheric soils. **Applied Soil Ecology**, v. 108, p. 315-324, 2016.

INGHAM, R. E.; TROFYMOW, J. A.; COLEMAN, D. C.. Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: effects on nutrient cycling and plant growth. **Ecological Monographs**, v. 55, n. 1, p. 119-140, 1985.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R.. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 9, n. 40, p. 2931-2944, 2005.

JUNIER, P. et al. Adaptive strategies in a poly-extreme environment: differentiation of vegetative cells in *Serratia ureilytica* and resistance to extreme conditions. **Frontiers In Microbiology**, v. 10, p. 102, 2019.

KAPOOR, M.; GUPTA, M.N.. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.

KARMAKAR, R. et al. Efeitos potenciais das mudanças climáticas nas propriedades do solo: uma revisão. **Science International**, v. 4, n. 2, p. 51-73, 2016.

KAVUTHODI, B.; SEBASTIAN, D.. Review on bacterial production of alkaline pectinase with special emphasis on *Bacillus* species. **Bioscience Biotechnology Research Communications**, v. 11, n. 1, p. 18-30, 2018.

KIILL, L. H. P. et al. **Preservação e uso da caatinga**. Brasília, Distrito Federal: Embrapa, 2007.

KIRK, J. L. et al. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal Of Microbiological Methods**. p. 169-188. 2004.

KUMAR S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549. 2018.

KOUKER, G.; JAEGER, K. E. Specific and sensitive assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 211-213, 1987.

LADYGINA, N.; HEDLUND, K.. As espécies vegetais influenciam a diversidade microbiana e a alocação de carbono na rizosfera. **Biologia do Solo e Bioquímica**, v. 42, n. 2, p. 162-168, 2010.

LAITY, J. J. **Deserts and desert environments**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2009.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic Acid Techniques. In: **Bacterial Systematics**, p. 125-175, 1991.

LIPCZYNSKA-KOCHANY, E.. Effect of climate change on humic substances and associated impacts on the quality of surface water and groundwater: a review. **Science Of The Total Environment**, v. 640, p. 1548-1565, 2018.

LIU, B. et al. *Bacillus populi* sp. nov. isolated from *Populus euphratica* rhizosphere soil of the Taklamakan desert. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**. p. 155-159. 2018

LOGAN, N. A. et al. Genus *I. bacillus*. **Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology**, p. 21-128, 2009.

LÓPEZ-GARCÍA, Purificación. Habitability: the point of view of a biologist. In: **Lectures in Astrobiology**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. p. 221-237.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª edição**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.

MARES, Michael A. **Encyclopedia of deserts**. Oklahoma: University Of Oklahoma Press, 2017.

MARTÍNEZ, J. L. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 1, 2012.

MARTINS, C. M. et al. Atributos químicos e microbianos do solo de áreas em processo de desertificação no semiárido de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 6, p. 1883-1890, 2010.

MATSUSHITA, K. et al. Genomic analyses of thermotolerant microorganisms used for high-temperature fermentations. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, v. 80, n. 4, p. 655-668, 2016.

MENDES, R. et al. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, v. 332, n. 6033, p. 1097-1100, 2011.

MENEZES, R. S. C. et al. Biogeochemical cycling in terrestrial ecosystems of the Caatinga Biome. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 643-653, 2012

MOHANDAS, A. et al. Production of pectinase from *Bacillus sonorensis* MPTD1. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 110, 2018.

MOREIRA, F. M de Souza; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002.

NANNIPIERI, P. et al. Soil enzymology: classical and molecular approaches. **Biology And Fertility Of Soils**, v. 48, n. 7, p. 734-762, 2012.

NANNIPIERI, P. et al. Microbial diversity and soil functions. **European Journal Of Soil Science**, v. 68, n. 1, p. 12-26, 2017.

NICHOLSON, W. L.; SCHUERGER, A. C.; DOUKI, T.. The photochemistry of unprotected DNA and DNA inside *Bacillus subtilis* spores exposed to simulated Martian surface conditions of atmospheric composition, temperature, pressure, and solar radiation. **Astrobiology**, v. 18, n. 4, p. 393-402, 2018.

NELSON, David L .; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7** . Artmed Editora, 2018.

NIELSEN, K. M.; CALAMAI, L.; PIETRAMELLARA, G.. **Stabilization of extracellular DNA and proteins by transient binding to various soil components**. Springer, Berlin, Heidelberg: Nucleic Acids And Proteins In Soil, 2006.

PATEL, S.; GUPTA, R. S.. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 406-438, 2020.

PAUL, C. et al. Bacterial spores, from ecology to biotechnology. **Advances In Applied Microbiology**, v. 106, p. 79-111, 2019.

PICA, A.; GRAZIANO, G.. Shedding light on the extra thermal stability of thermophilic proteins. **Biopolymers**, v. 105, n. 12, p. 856-863, 2016.

PIETIKÄINEN, J.; PETTERSSON, M.; BÅÅTH, E.. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. **Fems Microbiology Ecology**, v. 52, n. 1, p. 49-58, 2005.

PIKUTA, E. et al. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2109-2117, 2000.

POLI, A. et al. *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica). **Systematic and applied microbiology**, v. 29, n. 4, p. 300-307, 2006.

PRADO, D. E. (2003). As caatingas da América do Sul. In **Ecologia e Conservação da Caatinga**, ed. Leal, I., Tabarelli, M. & Silva, J.M.C. Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, p. 804.

PRATHYUSHA, K.; SUNEETHA., V.. **Bacterial pectinases and their potent biotechnological application in fruit processing/juice production industry: a review**. Journal Of Phytology, 2011.

QUEIROZ, L P. Distribuição das espécies de Leguminosae na Caatinga. **Associação de Plantas do Nordeste—apne**, Recife, PE, p. 141-153, 2002.

RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de Bacillus e gêneros esporulados aeróbios correlatos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação, 2015. 160p.

RASCHE, F.; CADISCH, G.. The molecular microbial perspective of organic matter turnover and nutrient cycling in tropical agroecosystems-What do we know? **Biology And Fertility Of Soils**, v. 49, n. 3, p. 251-262, 2013.

ROBICSEK, A.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C.. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 10, p. 629-640, 2006.

ROCCO, A. L. R. M. V.. **Thermophiles: Biodiversity, Ecology, and Evolution: Biodiversity, Ecology, and Evolution**. Springer Science & Business Media, 2001.

RODRIGUES, A.G. **Sistemas Agroflorestais no Semiárido Brasileiro**. Recife, PE: Centro Sabiá/caatinga, 2016.

ROLLI, E. et al. Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. **Environmental microbiology**, v. 17, n. 2, p. 316-331, 2015.

ROMAGNOLI, E. M.; ANDREOTE, F. D.. Rizosfera. **Microbiologia do solo**, p. 221 il, 2016.

ROOSDIANA, A. et al. Production and characterization of *Bacillus firmus* pectinase. **The Journal of Pure and Applied Chemistry Research**, v. 2, n. 1, p. 35-41, 2013.

ROSZAK, D. B.; COLWELL, R. R.. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 3, p. 365, 1987.

SAHOO, R. K. et al. Parameter optimization for thermostable lipase production and performance evaluation as prospective detergent additive. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, p. 1-7, 2020.

SALCEDO, IH, TIESSEN, H. SAMPAIO, EVSB (1997). Disponibilidade de nutrientes em amostras de solo de sítios de cultivo itinerante na Caatinga semi-árida do nordeste do Brasil. **Agricultura, Ecossistemas e Meio Ambiente**, 65 (2), 177-186.

SECKBACH, J. & OREN, A. (2007). Oxygenic photosynthetic microorganisms in extreme environments. In **Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments**. ed. J. Seckbach. Springer, Dordrecht, pp. 4–25.

SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. (org). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília (DF): MMA/UFPE/Conservation International – Biodiversitas – Embrapa Semi-árido, 2004. p. 382.

SINGHAL, P.; NIGAM, V. K.; VIDYARTHI, A. S. Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. **Int J Adv Biotechnol Res**, v. 3, n. 3, p. 653-69, 2012.

SONNLEITNER, Bernhard. Biotechnology of thermophilic bacteria—growth, products, and application. In: **Microbial Activities**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1983. p. 69-138.

SOUSA, R. F; FERNANDES, M. F.; BARBOSA, M. P.. Vulnerabilidades, semiaridez e desertificação: cenários de riscos no Cariri Paraibano. **Revista Okara: Geografia em Debate**, João Pessoa, PB, v. 2, n. 2, p. 190-202, 2008.

SOUZA, B. I.; SUERTEGARAY, D. M. A.; LIMA, E. R. V. Evolução da desertificação no Cariri paraibano a partir da análise das modificações na vegetação. Rio Claro (SP), **Geografia**, v. 36, n. 1, p. 193-205, jan./abr. 2011.

SOUZA, B. I.; ARTIGAS, R. C.; LIMA, E. R. V.. Caatinga e desertificação. **Mercator**, Fortaleza, v. 14, n. 1, p. 131-150, 2015.

STAMFORD, Newton P. et al. Microbiota dos solos tropicais. MICHEREFF, SJ; ABDRADE, DEGT; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, p. 61-92, 2005.

STAUNTON, J.; WEISSMAN, K. J.. Polyketide biosynthesis: a millennium review. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 380-416, 2001.

STEFANOV, Y. M.. Optimization of nutritive medium composition for production of amylase by *Bacillus* strains. **Journal Of Bioscience And Biotechnology**, v. 7, n. 2-3, p. 103-107, 2018.

SUGIMOTO, E. E.; HOITINK, H. A. J.; TUOVINEN, O. H. Enumeration of oligotrophic rhizosphere pseudomonads with diluted and selective media formulations. **Biology and fertility of soils**, v. 9, n. 3, p. 226-230, 1990.

TAYLOR, N. P; ZAPPI, D.. Distribuição das espécies de Cactaceae na caatinga. **Vegetação & Flora da Caatinga**. Recife: Associação de Plantas do Nordeste-apne, Recife, PE, p. 123-125, 2002.

TORIMIRO, N.; OKONJI, R. E. A comparative study of pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 46, p. 6498-6503, 2013.

TORSVIK, V.; GOKSÖYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied in Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 782-787, 2009.

THOMAS, C. M.; NIELSEN, K. M.. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 711, 2005.

TRAVASSOS, I.s.; SOUZA, B. S.. Solos e desertificação no sertão paraibano. **Cadernos do Logepa**, v. 6, n. 2, p. 101-114, 2011.

TRUU, M. et al. Elevated air humidity changes soil bacterial community structure in the silver birch stand. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, p. 557, 2017.

TKACZ, A. et al. Stability and succession of the rhizosphere microbiota depends upon plant type and soil composition. **The Isme Journal**. p. 2349-2359. 2015.

UDDIN, M. E. et al. Thermotolerant extracellular proteases produced by *Bacillus subtilis* isolated from local soil that representing industrial applications. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 733-741, 2017.

UDVARDI, Michael; POOPLE, P. S.. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. **Annual Review Of Plant Biology**, v. 64, p. 781-805, 2013.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M.. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 88-394, 2007.

UGRAS, S. Characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus licheniformis* Ht7 isolated from Hayran Thermal Springs in Giresun. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 22, n. 1, p. 12297-12306, 2017.

VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Pnas**, v. 121, n. 18, p. 5649-5654, 2015.

VORONEY, R. P.. The soil habitat. In: Soil microbiology, ecology and biochemistry. In: ELDOR, A. P.. **The soil habitat. In: Soil microbiology, ecology and biochemistry**. Academic Press, 2007. p. 25-49.

WALSH, C. T.. Insights into the chemical logic and enzymatic machinery of NRPS assembly lines. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 2, p. 127-135, 2016.

WARD, David. **The biology of deserts**. Oxford: Oxford University Press, 2016.

WILLADINO, L. et al. Sistema vascular e exsudatos radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, G.t.; MENEZES, M.. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife, PE: Imprensa Universitária, 2005. p. 19-40.

ZEIGLER, Daniel R.; PERKINS, John B. The genus bacillus. In: **Practical handbook of microbiology**. CRC Press, 2008. p. 329-358.