

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Paenibacillus*  
spp PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE ÁGUA E DE SOLO**

Anelise Beneduzi da Silveira  
Bióloga – UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do Grau de  
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre (RS)  
Fevereiro de 2003

ANELISE BENEDEZI DA SILVEIRA  
Bacharel em Ciências Biológicas - UFRGS

## DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

## MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

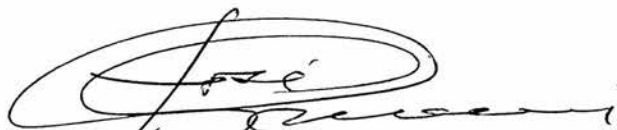
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 21.03.2003  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 29/04/2003  
Por



GERTRUDES CORÇÃO  
Orientadora-PPG-Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente



JOSÉ CARLOS GERMANI  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente



ANDRÉIA MARA ROTTA DE OLIVEIRA  
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA - MIRCEN/FEPAGRO



CLÁUDIO WAGEK CANAL  
DEP. DE MEDICINA ANIMAL - UFRGS



SUELI TERESINHA VAN DER SAND  
DEP. MICROBIOLOGIA - UFRGS



GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN  
Diretor da Faculdade  
de Agronomia

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Paenibacillus*  
spp PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE ÁGUA E DE SOLO**

Anelise Beneduzi da Silveira  
Bióloga – UFRGS

Fevereiro de 2003

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Gertrudes Corção pela orientação, paciência, apoio e amizade.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Dra. Sueli T. Van Der Sand, Dra. Marisa da Costa, Dr. Amauri Simonetti e Dr. José Carlos Germani pelas sugestões e amizade.

Aos colegas de curso, de laboratório e amigos Patrícia Bender, Margaroni F. de Oliveira, Neida Macedo e Luíz Gustavo A. Borges pelas sugestões, amizade e apoio.

Aos colegas de curso e amigos Adriana Giongo, César Crispim, Marcos Marquardt e Roberta Bandeira pelo apoio e amizade.

Aos colegas de laboratório e também amigos Cláudio, Emanuele Kuhn e Sabrina pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia.

Ao meu namorado Heraldo, pelo amor, carinho, dedicação, compreensão e paciência.

Aos meus pais, Venilda e José, pelo apoio, amor e carinho de sempre.

À todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

# IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Paenibacillus* spp PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE ÁGUA E DE SOLO <sup>1/</sup>

Autora: Anelise Beneduzi da Silveira  
Orientadora: Dra. Gertrudes Corção.

## RESUMO

O gênero *Paenibacillus*, anteriormente pertencente ao gênero *Bacillus*, tem como representantes bastonetes produtores de esporos que se diferenciam destes pelos padrões encontrados através da amplificação e seqüenciamento de um fragmento da subunidade 16S rDNA. Esse gênero é extremamente diverso sendo encontrado tanto em ambientes aquáticos como em ambientes terrestres, e seus representantes podendo ser desde patógenos de animais a fixadores de nitrogênio (associados ou não a plantas). Dos oitenta bastonetes Gram positivos esporulados isolados dos balneários de Ipanema, Belém Novo e Lami (Porto Alegre/RS), trinta e cinco foram identificados através de PCR como sendo do gênero *Paenibacillus* e dos sessenta isolados de solo provenientes de Belém Novo (Porto Alegre/RS) e Osório (RS), vinte e nove são pertencentes a este gênero. Nos isolados provenientes da água foram encontrados representantes de *P. validus* (8), *P. azotofixans* (6), *P. illinoisensis* (3), *P. chibensis* (3), *P. glucanolyticus* (3), *P. borealis* (2), *P. koreensis* (2), *P. brasiliensis* (2), *P. odorifer* (1), *P. apiarius* (1), *P. graminis* (1), *P. macerans* (1), *P. pabuli* (1) e *P. thiaminolyticus* (1). Entre os indivíduos provenientes de amostras de solo foram identificados *P. alginolyticus* (7), *P. pabuli* (5), *P. azotofixans* (3), *P. validus* (4), *P. thiaminolyticus* (2), *P. chibensis* (2), *P. apiarius* (2), *P. glucanolyticus* (2), *P. macquariensis* (1) e *P. peoriae* (1). A caracterização genética através de BOX-PCR produziu fragmentos de 4365 a 445bp e revelou vinte e oito grupamentos em um nível de similaridade de 73% nos isolados provenientes da água, e dezoito grupamentos a 70% nos isolados do solo. Pelas análises foi possível identificar um elevado grau de polimorfismo, com diferenças inter e intraespecíficas entre os isolados de *Paenibacillus*, isso sendo evidenciado pelo alto número de grupamentos encontrados. Os isolados de *Paenibacillus* provenientes da água e do solo puderam ser separados em grupamentos distintos através do BOX-PCR, sugerindo que populações distintas estejam estabelecendo-se nestes ambientes.

<sup>1/</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente- Biologia Molecular de Microrganismos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (139 p.) Fevereiro, 2003

# IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *Paenibacillus* spp ISOLATED FROM WATER AND SOIL SAMPLES<sup>1/</sup>

Autor: Anelise Beneduzi da Silveira  
Adviser: Gertrudes Corção, Ph. D.

## ABSTRACT

*Paenibacillus* genus, formerly *Bacillus* genus, are spore producer rod-shape that differ from *Bacillus* for the patterns found through 16S rDNA subunit amplification and sequencing. This genus is extremely diverse, being found both on aquatic and land environment, and it can be from animal pathogens to nitrogen fixer (associated or not to plants). From the eighty sporulated Gram positive rod-shape isolated from Ipanema, Belém Novo and Lami (Porto Alegre/RS), thirty-five were identified through PCR as being *Paenibacillus* genus and, from the sixty isolated soil samples collected in Belém Novo (Porto Alegre/RS) and Osório (RS), twenty-nine belonged to this genus. Isolates of *P. validus* (8), *P. azotofixans* (6), *P. illinoisensis* (3), *P. chibensis* (3), *P. glucanolyticus* (3), *P. borealis* (2), *P. koreensis* (2), *P. brasiliensis* (2), *P. odorifer* (1), *P. apiarius* (1), *P. graminis* (1), *P. macerans* (1), *P. pabuli* (1) and *P. thiaminolyticus* (1) were found on the isolated coming from water. Among the isolates coming from soil samples, it was identified *P. alginolyticus* (7), *P. pabuli* (5), *P. azotofixans* (3), *P. validus* (4), *P. thiaminolyticus* (2), *P. chibensis* (2), *P. apiarius* (2), *P. glucanolyticus* (2), *P. macquariensis* (1) and *P. peoriae* (1). The genetic characterization through BOX-PCR produced fragments from 4365 to 445bp and revealed twenty-eight groups with 73% similarity level on water isolates, and eighteen groups with 70% level on soil isolates. Through the ran out analysis a high degree of polymorphism were identified, with inter and intraspecific differences between the *Paenibacillus* isolates, what was observed with the high amount of groups found. The *Paenibacillus* isolates from water and soil could be separated in distinct groups through BOX-PCR, what suggests that different populations are being established in this environments.

<sup>1/</sup> Master of Science Dissertation in Environmental and Agricultural Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (139 p.) February of 2003.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. O gênero <i>Bacillus</i> e sua heterogeneidade filogenética.....	03
2.2. O gênero <i>Paenibacillus</i> .....	12
2.3. Seqüências repetitivas.....	17
2.3.1. Seqüências repetitivas BOX.....	20
2.4. Fixação Biológica de Nitrogênio.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1. Meios de cultura e soluções.....	32
3.2. Obtenção dos isolados bacterianos.....	32
3.3. Isolamento das amostras provenientes do solo.....	32
3.4. Identificação dos isolados bacterianos.....	34
3.5. Manutenção das culturas bacterianas.....	34
3.6. Preparo dos isolados bacterianos para a extração de DNA total.....	34
3.7. Protocolo para extração de DNA total.....	35
3.8. Quantificação do DNA total.....	36
3.9. Identificação do gênero <i>Paenibacillus</i> pela amplificação do gene 16S rRNA.....	36
3.10. Análise do fragmento amplificado de <i>Paenibacillus</i> .....	37
3.11. Identificação das espécies de <i>Paenibacillus</i> .....	37
3.12. Análise das seqüências repetitivas BOX.....	38
3.13. Análise dos fragmentos amplificados através do BOX-PCR.....	39
3.14. Análise dos resultados do BOX-PCR.....	39
3.15. Amplificação do gene <i>nifH</i> .....	40
3.16. Análise do fragmento amplificado do gene <i>nifH</i> .....	41
3.17. Marcadores moleculares.....	41
3.18. Teste de especificidade.....	41
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Identificação dos isolados provenientes da água e do solo.....	43
4.1.1. Identificação do gênero <i>Paenibacillus</i> .....	43
4.1.2. Identificação das espécies de <i>Paenibacillus</i> .....	44
4.2. Padronização das condições do BOX-PCR.....	64
4.2.1. Concentração de cloreto de magnésio.....	64
4.2.2. Concentração de DNA molde.....	65
4.2.3. Concentração do oligonucleotídeo iniciador BOXA1R.....	66
4.2.4. Concentração de BSA.....	66
4.2.5. Temperatura e número de ciclos.....	66
4.3. Perfil de BOX-PCR.....	67

4.4.	Análises dos dendrogramas de BOX-PCR.....	69
4.4.1.	Análise do dendrograma dos isolados provenientes da água	69
4.4.2.	Análise do dendrograma dos isolados provenientes do solo.	72
4.4.3.	Análise do dendrograma dos isolados provenientes da água e do solo.....	74
4.5.	Amplificação do gene <i>nifH</i> .....	77
5.	DISCUSSÃO.....	79
5.1.	Identificação do gênero <i>Paenibacillus</i> .....	79
5.2.	Caracterização genética dos isolados de <i>Paenibacillus</i> .....	82
5.3.	Confirmação das espécies fixadoras de nitrogênio.....	94
6.	CONCLUSÕES.....	97
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
9.	APÊNDICE.....	111
9.1.	Meios de cultura para crescimento, isolamento e identificação...	112
9.2.	Soluções utilizadas na extração de DNA total.....	111
9.3.	Soluções utilizadas para corrida em gel de agarose.....	120
9.4.	Soluções para PCR.....	122
9.5.	Matriz dos coeficientes de similaridade obtidos entre os isolados de <i>Paenibacillus</i> provenientes de amostras de água.....	123
9.6.	Matriz dos coeficientes de similaridade obtidos entre os isolados de <i>Paenibacillus</i> provenientes de amostras de solo.....	128
9.7.	Matriz dos coeficientes de similaridade obtidos entre os isolados de <i>Paenibacillus</i> provenientes de amostras de água e de solo.....	132



## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Linhagens padrão utilizadas como controles nos testes bioquímicos.....	38
2. Linhagens padrão utilizadas como controles nos ensaios de especificidade.....	42
3. Características fenotípicas das espécies e subespécies do gênero <i>Paenibacillus</i> .....	48
4. Identificação das espécies de <i>Paenibacillus</i> isoladas de amostras de água e de solo.....	63
5. Porcentagem de isolados provenientes do solo que amplificaram determinados fragmentos no BOX-PCR.....	69
6. Porcentagem de isolados provenientes da água que amplificaram determinados fragmentos no BOX-PCR.....	69

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Árvore filogenética construída a partir da matriz de distância da análise de seqüências do 16S rRNAs de bacilos, enterococos, lactobacilos e leuconostocos.....	6
2. Árvore de distância evolutiva mostrando a heterogeneidade do gênero <i>Bacillus</i> .....	8
3. Árvore de distância evolutiva mostrando as inter-relações do novo gênero <i>Paenibacillus</i> e outras espécies de <i>Bacillus</i> .....	11
4. Organização do elemento BOX em relação a alguns genes.....	21
5. Estrutura “stem-loop” da seqüência BOX.....	22
6. Amplificação do fragmento de 800bp de <i>Paenibacillus</i> .....	44
7. Chave de Identificação das espécies de <i>Paenibacillus</i> .....	58
8. Teste de concentração de cloreto de magnésio.....	64
9. Teste de concentração de DNA.....	65
10. Perfis de BOX-PCR.....	68
11. Dendrograma baseado em análises de BOX-PCR dos isolados provenientes da água.....	71
12. Dendrograma baseado em análises de BOX-PCR dos isolados provenientes do solo.....	73
13. Dendrograma baseado em análises de BOX-PCR dos isolados provenientes da água e do solo.....	76
14. Amplificação do gene <i>nifH</i> .....	77

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Paenibacillus*, anteriormente pertencente ao gênero *Bacillus*, tem como representantes bastonetes produtores de esporos que se diferenciaram destes pelos padrões encontrados através da amplificação e seqüenciamento de um fragmento da subunidade 16S rDNA e também por alguns representantes do gênero apresentarem o gene *nifH* (gene que codifica a proteína ferro do complexo da enzima nitrogenase). Esse gênero é extremamente diverso sendo encontrado tanto em ambientes aquáticos como em ambientes terrestres, e o seus representantes podendo ser desde patógenos de animais à fixadores de nitrogênio no solo (associados ou não a plantas).

A caracterização genética baseada no padrão de fragmentos gerada por "Polymerase Chain Reaction" (PCR) está sendo usada para o estudo de comunidades microbianas de diversos ambientes. Famílias de sequências repetitivas de DNA (REP, ERIC e BOX) estão espalhados por todo o genoma e são utilizados para produzir um padrão de fragmentos de DNA típico de diversas espécies bacterianas e podem revelar diferenças entre linhagens. Em particular, o elemento BOX que consiste de diferentes subsequências conservadas (BOX A, BOX B e BOX C) e que se encontra disperso por todo o genoma.

Devido a grande diversidade do gênero *Paenibacillus*, a identificação do gênero através do 16S rDNA aliada a caracterização molecular dos isolados através do elemento repetitivo BOX, pode ser uma ferramenta de rápida detecção de uma determinada espécie de *Paenibacillus*, já que somente os testes bioquímicos clássicos são insuficientes para a identificação deste gênero.

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Departamento de Microbiologia no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e teve como objetivos:

- identificar através da amplificação por PCR os isolados provenientes da água e do solo (rizosfera de milho) como pertencentes ao gênero *Paenibacillus* sp;
- caracterizar os isolados em nível de espécie através de provas bioquímicas clássicas;
- caracterizar molecularmente os isolados através da amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos BOX ;
- analisar e comparar os isolados da água e do solo em relação a suas características moleculares;
- comprovar a presença do gene *nifH* nos isolados identificados previamente como espécies fixadoras de nitrogênio.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O gênero *Bacillus* e sua heterogeneidade filogenética

Bactérias em forma de bastonetes, aeróbias ou anaeróbias facultativas e formadoras de esporos têm sido geralmente classificadas como sendo do gênero *Bacillus*, um taxon sistematicamente diverso (Claus & Berkeley, 1986). Os indivíduos pertencentes a este gênero estão entre os microrganismos mais largamente distribuídos e possuem papéis significantes nas comunidades microbianas (Reva et al., 1995).

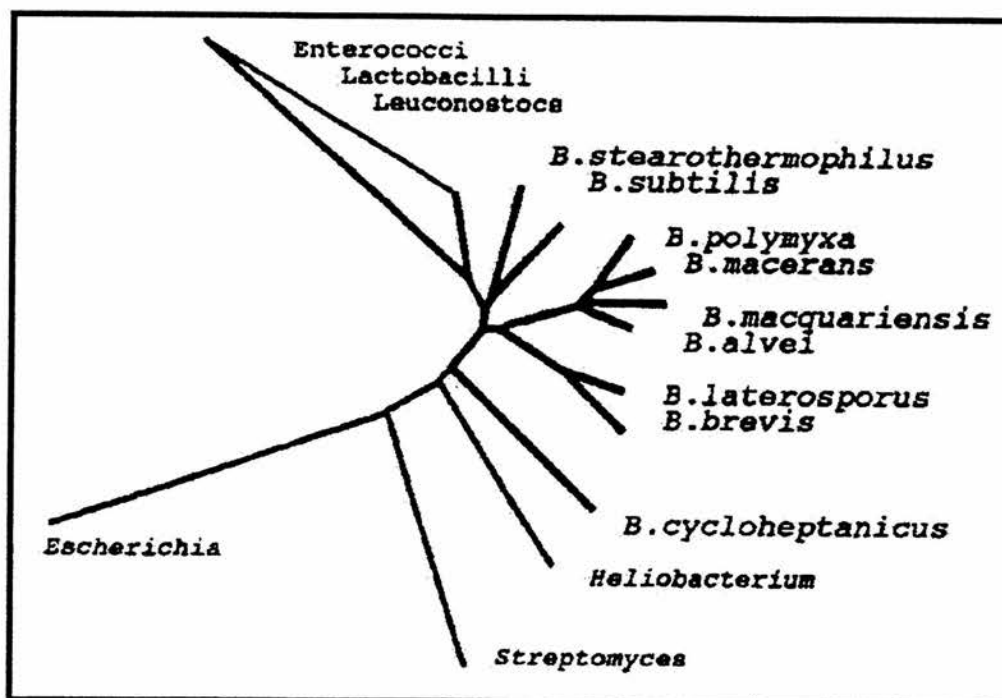
Embora representantes de *Bacillus* tenham sido extensivamente estudados, é conhecido que sua taxonomia é insatisfatória. O gênero *Bacillus* é fenotipicamente heterogêneo, com membros exibindo uma grande diversidade de requerimentos nutricionais, condições de crescimento, metabolismo e composição de DNA (32 a 69%mol G+C). Como exemplo dessa diversidade estão os organismos estritamente aeróbios, os anaeróbios facultativos e até mesmo acidófilos, alcalófilos, quimiolitotróficos, halófilos, psicrófilos e termófilos. Em adição a isto, há também uma forte evidência de heterogeneidade filogenética (Ash et al., 1993).

A primeira tentativa em nível molecular usada para separar este gênero foram análises comparativas da subunidade 16S do RNA ribossomal (16S rRNA). Estes estudos revelaram um único grupo diverso contendo a

maioria das espécies examinadas. Havia, entretanto, um número de espécies individuais (*Bacillus alvei*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. acidocaldarius* e *B. cycloheptanicus*) que foram até mais diversos e não pareceram pertencer àquele único grupo citado anteriormente. Dentro do grupo principal de *Bacillus*, as análises do 16S rRNA revelaram pelo menos dois grupos moderadamente relacionados: o primeiro consiste de organismos com esporos elípticos que estão localizados centralmente (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* e *B. cereus*) e o segundo subgrupo inclui organismos que formam esporos esféricos (*B. minovorans*, *B. globisporus*, *B. insolitus*, *B. pasteurii*, *B. sphaericus* e *Sporosarcina ureae*, bem como três organismos não formadores de esporos: *Planococcus citreus*, *Filibater limicola* e *Caryophanon latum*). Outros membros do grupo principal de *Bacillus* que têm sido examinados pelo 16S rRNA são *B. stearothermophilus* e *Thermoactinomyces vulgaris*. Embora estes resultados tenham um bom fundamento, estava claro que esse exame inicial era insuficiente para definir o grande número de relações dentro do gênero que seriam necessárias antes que revisões taxonômicas pudessem ser feitas. Também há uma interligação entre organismos não esporulados com esporulados, como citado acima, que necessita de trabalhos adicionais para o entendimento da relação das espécies de *Bacillus* com outros gêneros (Rössler et al., 1991).

No estudo de Rössler et al. (1991) foram introduzidos os primeiros resultados de uma análise do gênero *Bacillus* utilizando seqüências do 16S rRNA produzidas por sequenciamento direto com transcriptase reversa ou pela amplificação do DNA ribossomal. Novas seqüências do 16S rRNA foram

obtidas por este estudo (mais de 1300 nucleotídeos sequenciados). A análise comparativa revelou pelo menos quatro grupos de espécies de *Bacillus*: o grupo do *B. subtilis* que inclui também o *B. stearothermophilus*; o grupo do *B. brevis* que inclui *B. laterosporus* e o grupo do *B. alvei* que inclui o *B. polymyxa*, *B. macquariensis* e *B. macerans*. Também houve uma ramificação representada somente pelo *B. cycloheptanicus*. Esta análise mais completa não somente confirmou a diversidade entre três destes grupos estudados previamente pelo 16S rRNA, mas também encontrou um fundamento seguro para identificar um segundo membro do "grupo *B. brevis*" e dois novos membros do "grupo *B. alvei*". Dentro de cada um destes grupos existe uma similaridade de seqüências superior a 90% e entre os grupos a similaridade encontrada é menor que 90%. A distinção entre eles é ainda maior pelo fato que certas bactérias Gram positivas não formadoras de esporos, tais como os enterococos, lactobacilos e leuconostocos mostrarem uma similaridade de seqüências maior com *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* do que estes com os grupos do *B. brevis* e do *B. alvei*. De acordo com estes resultados, está claro que os organismos comumente colocados dentro do gênero *Bacillus* exibem grandes diferenças genotípicas que justificam a criação de novos gêneros. Dados fenotípicos também demonstram que diversidade e similaridades dos bacilos têm sido encontradas no grupo do *B. alvei*, todavia não existem as mesmas similaridades fenotípicas para os outros grupos definidos em nível genotípico (Figura 1).



**Figura 1.** Árvore filogenética construída a partir da matriz de distância da análise de seqüências do 16S rRNAs de bacilos, enterococos, lactobacilos e leuconostocos.  
Fonte: Rössler et al., 1991

Os estudos relativos ao 16S rRNA haviam sido restritos as nove espécies citadas acima, conseqüentemente não era possível traçar conclusões seguras sobre a estrutura filogenética do gênero (Ash et al., 1991).

Nos estudos de Ash et al. (1991) foram determinadas quase todas as seqüências da estrutura do 16S rRNA (95% da molécula total, 1450 a 1490 nucleotídeos) de mais de cinquenta espécies de *Bacillus* usando-se a transcriptase reversa. Uma considerável diversidade filogenética dentro do gênero foi evidenciada através dos cinco grupos distintos produzidos pela análise da matriz de distância. O grupo maior ou grupo 1 compreende vinte e oito espécies de bacilos: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. medusa*, *B. mycoides* e *B.*



*thuringiensis* formam um subgrupo; *B. atrophaeus*, *B. amyloliquifaciens*, *B. lautus*, *B. lentimorbus*, *B. licheniformis*, *B. popilliae*, *B. pumilus* e *B. subtilis* formam outro subgrupo; e *B. maroccanus*, *B. simplex* e *B. psychrosaccharolyticus* outro subgrupo. Muitos outros bacilos formaram ramificações distintas e não possuem relações específicas com outras espécies dentro do grupo. O grupo 2 é formado pelas espécies: *B. fusiformis*, *B. globisporus*, *B. insolitus*, *B. pasteurii*, *B. psychrophilus* e *B. sphaericus*. *Sporosarcina ureae* também foi colocada neste grupo. O grupo 3 consiste de *B. macerans* e nove outras espécies (*B. amylolyticus*, *B. macquariensis*, *B. pabuli*, *B. azotofixans*, *B. polymyxa*, *B. pulvifaciens*, *B. larvae*, *B. gordonae* e *B. alvei*). Este grupo exibe uma baixa homologia de seqüências com os outros *Bacillus* e pelo modelo de ramificação da árvore constitui um agrupamento distinto. O grupo 4 consiste de duas espécies: *B. brevis* e *B. laterosporus* e formam uma linha distinta de origem exibindo um baixo nível de relação com todos os outros bacilos examinados. *B. stearothermophilus*, *B. kaustophilus* e *B. thermoglucosidasius* formam o grupo 5. O acidófilo e termofílico, *B. cycloheptanicus*, exibiu a menor similaridade de seqüências com todas as outras espécies examinadas e claramente representa um taxon separado. Das outras espécies formadoras de esporos estudadas, *B. alcalophilus* e *B. aneurinolyticus* permaneceram fora dos grupos, assim como *Sporolactobacillus inulinus* que também formou uma linha separada de origem (Figura 2).

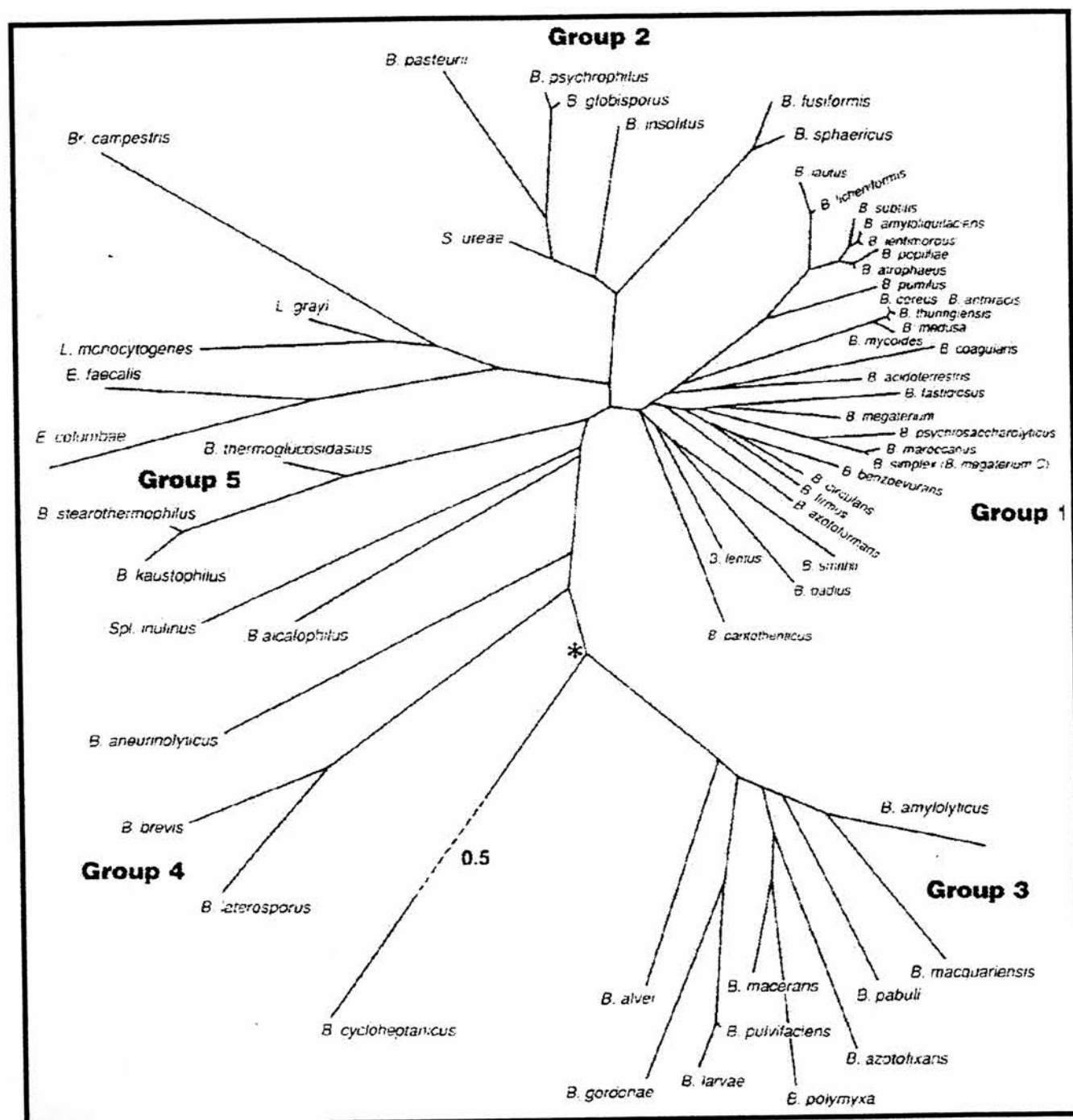


Figura 2. Árvore de distância evolutiva mostrando a heterogeneidade do gênero *Bacillus*.

Fonte: Ash et al., 1991

Os resultados do estudo de Ash et al. (1991) com a análise da seqüência do 16S rRNA reafirmaram a inadequação de definir gêneros baseados em critérios fenotípicos. Está claro que o gênero *Bacillus* é filogeneticamente muito heterogêneo e requer revisões taxonômicas extensivas. Os cinco grupos genéticos criados a partir da análise da matriz de distância claramente representam gêneros distintos.

A base da sistemática bacteriana está sofrendo mudanças fundamentais, características fenotípicas clássicas estão sendo substituídas por critérios moleculares e genéticos. A classificação microbiana no futuro será baseada nestes critérios (seqüências e estruturas). As seqüências de nucleotídeos podem revelar relações evolucionárias, enquanto que caracteres fenotípicos podem não revelar (Heyndrickx et al., 1995).

Em 1992, o Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana, mais especificamente o Subcomitê da Taxonomia do gênero *Bacillus* decidiu realizar um estudo taxonômico polifásico deste gênero com o objetivo de estabelecer procedimentos padrões para a descrição de espécies e revisão da nomenclatura (Heyndrickx et al., 1995).

Recentemente a reorganização do gênero *Bacillus* foi iniciada com a introdução do novo gênero *Alicyclobacillus*, para as espécies termofílicas e acidófilas que contém os ácidos graxos  $\omega$ -ciclohexano ou  $\omega$ -cicloheptano (*B. cycloheptanicus*) (Ash et al., 1993).

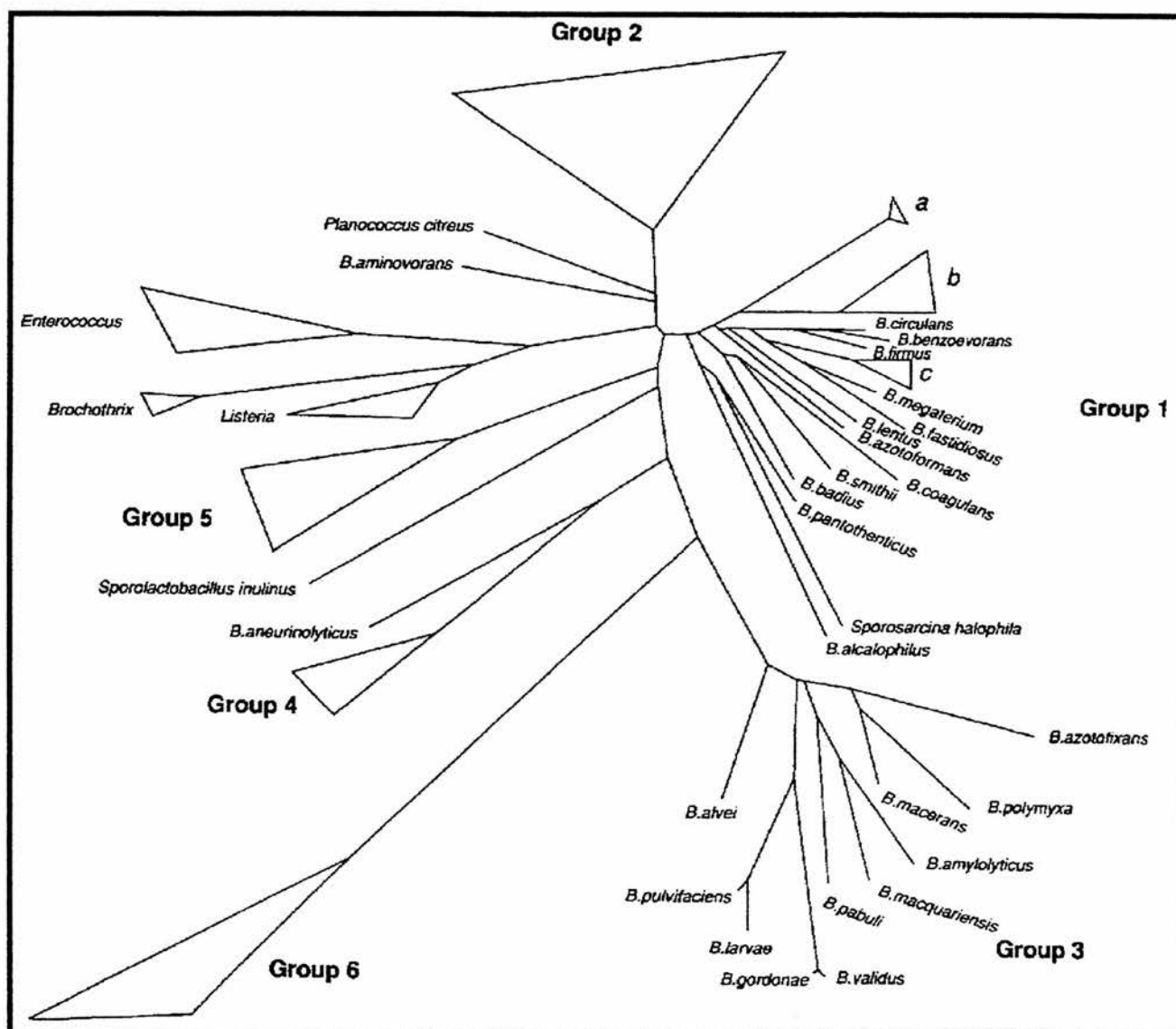
Estudos taxonômicos mostraram que linhagens pertencentes às espécies *B. brevis* deveriam ser transformadas em nove novas espécies e a espécie *B. aneurinoliticus* também foi revista. Essas duas espécies foram

renomeadas como sendo os novos gêneros *Brevibacillus* e *Aneurinibacillus* respectivamente (Shida et al., 1996).

Subseqüentemente os outros grupos filogenéticos também foram renomeados como novos gêneros: *Halobacillus* (Spring et al., 1996), *Virgibacillus* (Heyndrickx et al., 1998), *Gracilibacillus*, *Salibacillus* (Wainø et al., 1999 apud Yoon et al. 2002), *Coprobacillus* (Aguilera et al., 2001), *Amphibacillus* (Nimura et al., 1990 apud Xu & Côté não publicado), *Filobacillus* (Schlesner et al., 2001 apud Xu & Côté não publicado), *Geobacillus* (Nazina et al., 2001 apud Xu & Côté não publicado), *Ureibacillus* (Fortina et al., 2001 apud Xu & Côté não publicado), *Jeotgalibacillus* e *Marinibacillus* (Yoon et al., 2001 apud Xu & Côté não publicado).

Ash et al. (1993) propôs que vários membros deste gênero deveriam ser reclassificados no novo gênero *Paenibacillus*. Nesses estudos, uma sonda altamente específica baseada em características do 16S rRNA foi descrita e com isso foi encontrado um mecanismo seguro de diferenciar membros do novo gênero de outros bacilos produtores de esporos. Essa análise revelou a presença de uma seqüência potencialmente característica para o grupo três de *Bacillus*, na região variável V5 do 16S rDNA. Todas as espécies do grupo três testadas (*B. alvei*, *B. amylolyticus*, *B. azotofixans*, *B. gordonae*, *B. larvae*, *B. macerans*, *B. macquariensis*, *B. pabuli*, *B. polymyxa*, *B. pulvificiens* e *B. validus*) reagiram positivamente com a sonda enquanto outros bacilos e *Alicyclobacillus acidocaldarius* não hibridizaram. Com os resultados de Ash et al. e este trabalho de 1993, foi possível concluir que o grupo três representa um grupo filogeneticamente distinto. Membros deste grupo exibem alta homologia

dessas seqüências e são remotamente relacionados com *B. subtilis* que é a espécie padrão do gênero *Bacillus* (Figura 3).



**Figura 3.** Árvore filogenética mostrando as inter relações do novo gênero *Paenibacillus* e outras espécies de *Bacillus*. Grupos 1 a 5 como definidos por Ash et al. (1991). Grupo 1 (a) *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis*; (b) *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. lautus*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* e *B. subtilis*; (c) *B. maroccanus*, *B. psychrosaccharolyticus* e *B. simplex*.

Fonte: Ash et al., 1993.

Um oligonucleotídeo iniciador altamente específico denominado PAEN515F foi desenhado baseado numa seqüência de DNA encontrada no gene 16S rRNA das espécies de *Paenibacillus*. Assim como a hibridização usada por Ash et al. (1991) e a amplificação usando oligonucleotídeos específicos para o gênero *Brevibacillus* e *Aneurinibacillus* usada por Shida et al. (1996), o gênero *Paenibacillus* foi diferenciado com sucesso de outros *Bacillus* usando PAEN515F (Shida et al., 1997a).

Estudos anteriores têm mostrado que amplificações pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de fragmentos do gene 16S rRNA usando oligonucleotídeos iniciadores específicos é muito útil para a identificação de bactérias, como exemplo este procedimento é rápido e específico para identificar membros de *Francisella* em nível de gênero, espécie e subespécie. Oligonucleotídeos iniciadores foram usados para identificar o gênero *Aneurinibacillus* e *Brevibacillus* e foram altamente específicos. Somente o uso de características fenotípicas para a diferenciação e identificação de Bacillaceae são inadequadas e o uso de sondas e oligonucleotídeos iniciadores de detecção específica deveriam ser amplamente usados para a diferenciação destes (Shida et al., 1996).

## **2.2. O gênero *Paenibacillus***

Os membros do gênero *Paenibacillus* são organismos em forma de bastonetes, aeróbios ou anaeróbios facultativos que produzem esporos elípticos. Fenotipicamente as espécies deste grupo reagem fracamente com a coloração de Gram e até mesmo colônias jovens podem aparecer Gram

negativas, apesar de terem a estrutura Gram positiva. O DNA é composto de G+C (mol%) entre 40 e 54 (Shida et al., 1996). São organismos móveis por mecanismos de flagelos peritríquios e não produzem pigmentos (Ash et al., 1993). Também podem excretar uma variedade de enzimas extracelulares de hidrólise de polissacarídeos complexos como alginato, condroitina, quitina, curdlano e outros (Shida et al., 1997a). Alguns membros são conhecidos por produzirem polissacarídeos (Yoon et al., 2002) e compostos antimicrobianos tais como polimixina, octopitina, bacifelacina e antifúngicos (Chung et al., 2000).

Espécies de *Paenibacillus* têm sido isoladas de uma grande variedade de fontes, incluindo solo, água, rizosferas de plantas, raízes de árvores, materiais vegetais, alimentos, forragem, fezes e larvas de insetos (Daane et al., 2002). Isolados bacterianos pertencentes a esse gênero também têm sido encontrados no lago Vostok na Antártida (Christner et al., 2001), na cobertura de gelo de montanhas na China (Christner et al., 2000), em pinturas biodeterioradas (Heyrman & Swings, 2001), em águas marinhas (Siefert et al., 2000), em biofilmes redutores de mercúrio (Wagner-Döbler et al., 2000) e em sedimentos estuarinos contaminados com petróleo (Daane et al., 2002). Esse gênero também foi abundantemente encontrado em empresas que produzem papéis para a indústria alimentícia (Raaska et al., 2002).

O gênero *Paenibacillus* como proposto por Ash et al. (1993), representa um novo filo que consiste das seguintes espécies: *P. polymyxa*, *P. alvei*, *P. azotofixans*, *P. pabuli*, *P. macerans*, *P. macquariensis* e *P. amylolyticus* (Ash et al., 1993); *P. alginolyticus*, *P. chondroitinus*, *P. glucanolyticus*, *P. curdlanolyticus*, *P. kobensis* e *P. thiaminolyticus* (Shida et al.,

1997a); *P. larvae* subsp. *larvae* e *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* (Heyndrickx et al., 1996a); *P. lautus* e *P. peoriae* (Heyndrickx et al., 1996b); *P. gordonae* e seu sinônimo *P. validus* (Heyndrickx et al., 1995), *P. durum* como sinônimo de *P. azotofixans* (Rosado et al., 1997); *P. illinoisensis* e *P. chibensis* (Shida et al., 1997b); *P. dendritiformis* (Tcherpakov et al., 1999); *P. jamilae* (Aguilera et al., 2001); *P. graminis* e *P. odorifer* (Berge et al., 2002); *P. lentimorbus* e *P. popilliae* (Pettersson et al., 1999); *P. koreensis* (Chung et al., 2000); *P. apiarius* (Nakamura, 1996); *P. azoreducens* (Meehan et al., 2001); *P. naphthalenovorans* (Daane et al., 2002); *P. campinasensis* (Yoon et al., 1998); *P. borealis* (Elo et al., 2001); *P. chinjuensis* (Yoon et al., 2002); *P. granivorans* (van der Maarel et al., 2000); *P. brasilensis* (von der Weid et al., 2002); *P. koleovorans* (Takeda et al., 2002); *P. turicensis* (Bosshard et al., 2002); *P. glycanilyticus* (Dasman et al., 2002) e *P. daejeonensis* (Lee et al., 2002).

Várias espécies descritas como bacilos fixadores de nitrogênio pertencem a esse gênero tais como: *P. polymyxa*, *P. macerans* e *P. azotofixans* (Rosado et al., 1998), *P. peoriae* (Shida et al., 1997a), *P. borealis* (Elo et al., 2001), *P. graminis* e *P. odorifer* (Berge et al., 2002) e *P. brasilensis* (von der Weid et al., 2002).

Atualmente, o interesse em microrganismos do solo tem aumentado significativamente na medida que eles têm um importante papel na manutenção da fertilidade do solo. A maior mudança para o desenvolvimento da agricultura sustentável é o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio, hábeis em assimilá-lo da atmosfera (Seldin et al., 1998).



Além da fixação de nitrogênio, *P. polymyxa* solubiliza o fósforo no solo, produz antibióticos, quitinase e outras enzimas hidrolíticas, acentua a porosidade do solo e produz compostos promotores de crescimento em plantas similares em atividade ao ácido indol acético (AIA) (Timmusk et al., 1999). Ainda aumenta a captação de nutrientes pela planta e age como biocontrolador de microrganismos patógenos nativos (Chanway, 1995). Esta espécie também tem sido usada em controles biológicos contra *Fusarium* e *Pythium* (Guenouri-Athmani et al., 2000).

O *P. azotofixans* é o principal representante de *Paenibacillus* isolado de solos e raízes de cana-de-açúcar, trigo e outras gramíneas. A característica interessante dessa espécie está relacionada com a sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio, mesmo em presença de altos níveis de nitrato e com a produção de substâncias antimicrobianas (Neves & Rumjanek, 1998). *P. azotofixans* apresenta uma capacidade *in vitro* de fixar nitrogênio superior às outras espécies, e por não ser afetada pela presença de nitrato, a fixação em áreas com fertilizantes é possível (Rosado et al., 1996).

Outros representantes são patógenos, tais como *P. larvae* subsp. *larvae* e subsp. *pulvificiens*, que causam a mais séria doença americana de origem bacteriana em abelhas produtoras de mel (*Apis mellifera*) afetando seus estágios larvais e pupais (Allipi & Aguilar, 1998, Heyndrickx et al., 1996a).

A espécie *P. alvei* produz sintomas em larvas similares às produzidas por *P. larvae*, causando a mais séria doença européia em abelhas. Ao contrário de *P. larvae* que se encontra apenas associado à abelhas, *P. alvei* ocupa muitos nichos ambientais incluindo o solo, leite, larvas de mosquito e seres

humanos. Esta espécie produz alveolisina, uma toxina que é altamente homóloga a listeriolisina O, perfringolisina O, pneumolisina e estreptolisina O (Djordjevic et al., 2000).

O *P. apiaris* é outra espécie isolada de ambientes com abelhas juntamente com *P. thiaminolyticus*, mas está distantemente relacionado a outros *Paenibacillus* associados a abelhas (Nakamura, 1996, Shida et al., 1997).

A maioria das espécies do gênero *Paenibacillus* secretam uma variedade de enzimas extracelulares. *P. azoreducens* degrada corantes têxteis de efluentes de indústrias (Meehan et al., 2001), *P. validus* e *P. naphthalenovorans* degradam hidrocarbonetos poliaromáticos (Daane et al., 2002), *P. jamilae* degrada alpequina (resíduo aquoso tóxico produzido na extração do óleo de oliva) (Aguilera et al., 2001), *P. glucanolyticus* degrada uma variedade de  $\beta$ -glucanos como celulose, laminarina e pustulano (Alexander & Priest, 1989), *P. lautus*, *P. curdlanolyticus* e *P. kobensis* degradam curdlano, *P. alginolyticus* e *P. chondroitinus* degradam alginato (Shida et al., 1997a).

Há ainda os que produzem exopolissacarídeos como *P. chinjuensis* (Yoon et al., 2002) e *P. jamilae* (Aguilera et al., 2001). *P. campinasensis* produz ciclodextrina de amido, sendo a única espécie alcalófila e ocupando uma posição filogenética distinta dentro desse gênero (Yoon et al., 1998).

*P. koreensis* produz compostos antifúngicos (tipo iturin) que inibem o crescimento de vários patógenos de plantas e animais tais como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Candida albicans* entre outros. Esta espécie é usada como controlador biológico desses patógenos por causa de sua

habilidade em degradar quitina, o maior componente da parede celular dos fungos (Chung et al., 2000).

Algumas outras espécies formam modelos complexos e diferentes de colônias durante o seu desenvolvimento como o *P. dendritiformis* (Tcherpakov et al., 1999).

No estudo de Ash et al. (1993), as espécies *P. lentimorbus* e *P. popilliae* foram colocadas no grupo 1 de *Bacillus* onde a espécie padrão é o *B. subtilis*. Entretanto, *P. lentimorbus* e *P. popilliae* têm várias características fisiológicas e ecológicas em comum com várias espécies de *Paenibacillus* incluindo a reação de Gram variável e a perda da catalase (em comum com *P. larvae*). Adicionalmente, uma análise de características fenotípicas os colocou no grupo de outros *Paenibacillus* associados com insetos, por causarem doenças nestes. Estas observações sugeriram que eles foram mal classificados no grupo 1 de Ash et al. (1993) e através de novos estudo das seqüências do gene 16S rRNA eles foram incluídos no gênero *Paenibacillus* (Pettersson et al., 1999).

### **2.3 Seqüências repetitivas**

As seqüências repetitivas estão presentes nos genomas de todos os organismos. Embora a função precisa dessas seqüências em genomas de procariotos seja obscura, sua presença pode ser explorada para várias aplicações e manipulações moleculares. Estas seqüências estão começando a prover novas metodologias para a identificação e análise genética de

microrganismos e provavelmente possuem um importante papel nos estudos de microrganismos futuramente (Lupski & Weinstock, 1992).

O DNA cromossomal dos procariotos contém uma variedade de seqüências repetitivas com baixo número de cópias, tais como elementos de inserção, operons de RNA ribossomal, genes de RNA transportador e outros. Estas seqüências podem contribuir para a evolução da estrutura cromossomal através de rearranjos do DNA tais como deleções cromossomais, duplicações e inversões. Genes repetitivos também fornecem mecanismos para aumentar a virulência bacteriana (Lupski & Weinstock, 1992).

A seqüência repetitiva que foi primeiro descrita e mais estudada é o "repetitive extragenic palindrome" (REP) ou "palindromic unit sequence" (PU), inicialmente identificado em *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* (Lupski & Weinstock, 1992).

A estrutura do REP consiste em uma seqüência consenso de 38 nucleotídeos em forma de palíndromo que pode formar uma estrutura "stem-loop" estável. As funções atribuídas para a seqüência REP ou PU incluem regulação gênica por tradução diferencial dentro de operons policistrônicos e retrorregulação por estabilização do RNA mensageiro. O fato de que os elementos REP não estão sempre presentes nas mesmas regiões intergênicas, em diferentes espécies, indica que eles não são um elemento essencial no mecanismo da expressão gênica. Entretanto, quando presentes eles podem influenciar a quantidade ou regulação da expressão de um gene ou de um operon. Adicionalmente outras funções têm sido atribuídas: como a ligação a DNA girase e a DNA polimerase. Estes estudos têm levado a propor que o PU

ou REP está envolvido no empacotamento do DNA cromossomal bacteriano dentro de domínios independentes superenovelados (Lupski & Weinstock, 1992).

Outro elemento repetitivo interespaçado em genomas de procariotos foi identificado em *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e outros membros da família Enterobacteriaceae. Este foi denominado "intergenic repeat unit" (IRU) ou "enterobacterial repetitive intergenic consensus" (ERIC). O ERIC ou IRU é uma seqüência de aproximadamente 126bp de comprimento e como a seqüência REP, está localizado em regiões transcritas e não codificantes do cromossomo e inclui uma repetição invertida conservada (Lupski & Weinstock, 1992). A seqüência ERIC foi descrita em detalhes em 1990 e 1991 (van Belkum et al. ,1998) e foi utilizada com sucesso por Guemouri-Athmani et al. (2000) para diferenciar isolados de *Paenibacillus polymyxa* de acordo com a sua origem (solos cultivados com trigo a 5, 26, 70 e 2000 anos), sendo a estrutura genética afetada quanto maior o tempo de cultivo.

Os protocolos correspondentes são referidos como REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR e rep-PCR coletivamente. Os fragmentos amplificados podem ser resolvidos em um gel, produzindo um perfil referido como padrões genômicos rep-PCR. Uma das grandes vantagens destes padrões é que estes podem ser gerados não somente de DNA genômico purificado, mas também diretamente de lisados, células de culturas líquidas ou colônias em placas e de tecidos infectados tais como nódulos de raízes ou lesões de plantas. O padrão genômico de rep-PCR gerado de isolados bacterianos permite a diferenciação das bactérias em espécies, subespécies e linhagens, e pode representar o mais

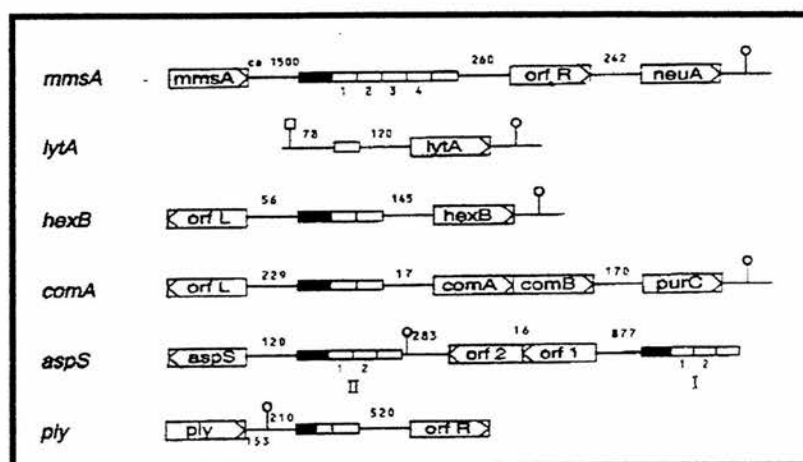
discriminatório e reproduzível método de padrão genômico disponível para a rápida análise de amostras (Rademaker et al., 1997).

### 2.3.1 Seqüências Repetitivas BOX

Uma terceira seqüência repetitiva descoberta no genoma de *Streptococcus pneumoniae* foi denominada BOX. Este elemento repetitivo foi descoberto nos estudos de Martin et al. (1992) onde um fragmento clonado carregando o gene *mmsA* de *S. pneumoniae* (envolvido no reparo e recombinação do DNA), hibridizou com um número de fragmentos de uma clivagem total cromossomal além de hibridizar com os fragmentos do gene *mmsA*. A região responsável por estas múltiplas hibridizações foi mapeada e um fragmento de 340bp conseguido pela clivagem com *HpaI* e *PvuII* foi localizado a 1,5kb após o gene *mmsA*. Quando usado como sonda, este fragmento de 340bp hibridizou com 25 fragmentos cromossomais diferentes.

O sequenciamento do DNA deste fragmento de 340bp revelou a presença de quatro repetições diretas de um segmento de 45bp (boxB). Uma seqüência similar foi também identificada no centro de uma região de 150bp de alta homologia entre as regiões dos genes *hexB* e *comA*. Comparações das seqüências envolvendo as repetições de 45bp do fragmento *mmsA* com aquele em *hexB* e *comA* revelaram que ambas regiões flanqueadoras 5' (boxA, 59bp) e 3' (boxC, 50bp) foram também altamente conservadas. O elemento total (incluindo alguma combinação de boxA, boxB e/ou boxC) foi denominada BOX. A região do fragmento *comA* hibridizou com 6 a 10 diferentes fragmentos do cromossomo de *S. pneumoniae*. As seqüências de 45 bp (boxB) também foram

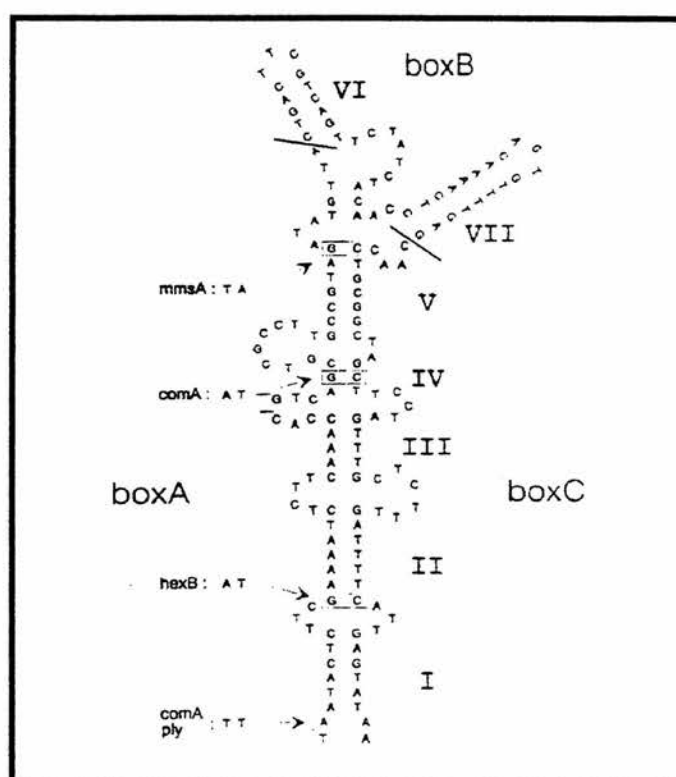
identificadas antes do fragmento do gene *lytA* de *S. pneumoniae* e no gene *neuA* e após o gene *ply* que codifica pneumolisina, também foram identificadas em um fragmento clonado possivelmente contendo um determinante de resistência a penicilina, *aspS* (Figura 4).



**Figura 4.** Organização do elemento BOX em relação a alguns genes. Box A, box B e box C estão indicados pelos retângulos preto, branco e pela linha sombreada. Fonte: Martin et al., 1992

A existência dos elementos BOX contendo um único boxB (locus *lytA*) ou um número variável de repetições adjacentes deste (fragmentos *mmsA* e *aspS*) sugere que o boxB é o elemento básico ao redor do qual a estrutura modular do BOX está organizado. O alinhamento de todas as seqüências BOX obtidas dos fragmentos de genes citados acima revelou um alto grau de similaridade para cada subunidade (acima de 90% para todo o elemento BOX). O elemento BOX consenso é constituído, de 5' para 3', de três subunidades: boxA (59bp), boxB (45bp) e boxC (50bp) e seu comprimento total é de 154bp (Martin et al., 1992).

Um exame do elemento BOX de 154bp revelou várias seqüências invertidas e repetidas que poderiam levar a formação de um grampo no DNA ou uma “stem-loop” estável em um transcrito de RNA desta molécula (Figura 5). Uma estrutura proposta seria um “stem-loop” que poderia ser formada entre boxA e boxC para todos os elementos BOX. Em vários casos onde os BOXs diferem do consenso, uma mudança de base compensatória é vista no braço complementar da “stem-loop”, sugerindo que a manutenção da estrutura secundária é importante (Martin et al., 1992).



**Figura 5.** Estrutura “stem-loop” da sequência BOX. As flechas indicam a localização das mudanças de bases compensatórias que ainda mantém a estrutura.  
Fonte: Martin et al., 1992.



Sondas com oligonucleotídeos complementares às seqüências das subunidades revelaram que somente a subunidade boxA aparece altamente conservada entre diversas bactérias. Seqüências similares às subunidades boxB e boxC foram somente encontradas em *S. pneumoniae*. Todavia, o modelo de conservação de um elemento repetitivo pode não estar correlacionado com a filogenia estabelecida. A subunidade boxA estava dispersa e presente em um alto número de cópias em *S. pneumoniae*, mas não estava presente em outros estreptococos tais como *S. pyogenes* e *S. agalactiae*. Entretanto, organismos Gram negativos não relacionados tais como *E. coli* e *S. typhimurium* continham múltiplas cópias de seqüências boxA dispersas em seu genoma (Versalovic et al., 1994).

Na procura por uma função específica dos elementos BOX, foi observado que vários destes elementos estão localizados nas vizinhanças de genes cujas funções são relacionadas ao processo de transformação gênica. Estes incluem os genes *comA*, *hexB* e possivelmente *mmsA*. O gene *comA* controla a competência para a transformação gênica. O gene *hexB* codifica um componente essencial do sistema de reparo Hex, na qual elimina os maus pareamentos de bases que surgem no DNA durante a transformação (Martin et al., 1992).

Muitos dos outros elementos BOX identificados estão localizados próximos à genes possivelmente envolvidos na virulência de *S. pneumoniae*. Estes incluem o gene *neuA* que codifica neuraminidase, um fator de virulência de pneumococos e o gene *ply* que codifica pneumolisina, outro fator de virulência. Finalmente, a função do gene *lytA* está relacionada a transformação

e virulência. A localização dos elementos BOX nas vizinhanças dos genes envolvidos na competência ou virulência acentua a possibilidade de uma conexão regulatória entre estes. O desenvolvimento da competência para transformação gênica pode ser modulado por mudanças nas condições de crescimento tais como temperatura, pH inicial da cultura e concentrações de cálcio e magnésio. Embora a possível regulação da virulência de *S. pneumoniae* não foi ainda documentada, a expressão por parte de várias bactérias patogênicas, é conhecida por ser controlada por esses sinais ambientais. Isto leva-nos a especular que os elementos BOX poderiam estar envolvidos na expressão coordenada de genes de competência específicos e virulentos. Ambas transformação e virulência poderiam ser vistas como uma resposta global do *S. pneumoniae* a mudanças das condições ambientais (Martin et al., 1992).

As seqüências BOX são o primeiro grupo de elementos de DNA repetitivos altamente conservados encontrados em uma bactéria Gram positiva. Embora a seqüência de nucleotídeos seja inteiramente diferente, várias características de BOX são similares a estas de ERIC e de REP. Com respeito ao seu tamanho e número estimado de cópias, as seqüências BOX são mais similares ao ERIC do que ao REP, entretanto, diferente de ERIC, ele tem uma estrutura modular. O DNA não codificante e repetitivo é provavelmente mantido em um nível mínimo em *S. pneumoniae*, dado o pequeno tamanho de seu genoma quando comparado ao de *E. coli* (2270kb e 4700kb, respectivamente). A menos que as seqüências BOX sejam mantidas como um DNA "egoísta", um papel funcional como elemento regulatório deveria explicar sua persistência e

conservação de seqüências em *S. pneumoniae*. Pode-se especular que o BOX representa um caso de evolução de um elemento de DNA repetitivo recrutado para uma função específica (Martin et al., 1992).

A utilização das seqüências BOX ou a técnica de BOX-PCR é muito mais sensível para detectar diferenças entre linhagens quando comparada, por exemplo, à técnica de "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP) do 16S rRNA, tendo várias vantagens sobre esta: o 16S rDNA é somente uma pequena fração do genoma e os elementos BOX estão espalhados por todo o cromossomo; algumas partes do 16S rDNA são variáveis enquanto que as subunidades do BOX são altamente conservadas; digestões do 16S rDNA geram menos de oito bandas e o BOX PCR pode gerar até mais de doze bandas; mutações pontuais podem acabar ou modificar os sítios de restrição para o RFLP do 16S rDNA mas não afetam o perfil do BOX PCR (Jarvis et al., 2001).

Existem também algumas diferenças cruciais comparando-se o rep-PCR e a técnica de RAPD ("Random Amplified Polymorphic"). A maior diferença é o tamanho dos oligonucleotídeos iniciadores e as condições usadas no PCR. O RAPD usa oligonucleotídeos curtos com seqüências arbitrárias e o rep-PCR usa oligonucleotídeos maiores e com alta homologia a seqüências repetitivas. O rep-PCR usa condições mais definidas, o qual reduz a variação experimental e os artefatos de PCR (Louws et al., 1994).

Van Belkum et al. (1996) testaram vários tipos de oligonucleotídeos BOX em *S. pneumoniae*: BOX A, BOX B, BR-1 e BR-2A. Somente o oligonucleotídeo BOX A gerou quantidades satisfatórias de amplificações em

números e tamanhos altamente variáveis e com isso foi concluído que o BOX-PCR possui excelente capacidade discriminatória. Os oligonucleotídeos BR-1 e BR-2 não geraram amplificações e o BOX C só gerou uma amplificação de 2kb. Também foi observado que certas espécies de *Streptococcus*, tais como *S. intermedius* não amplificam fragmentos, indicando que os elementos BOX podem ser restritos somente a certas espécies.

O BOX-PCR foi usado com sucesso para determinar as relações genéticas e diversidade de *B. anthracis* e espécies relacionadas (Kim et al., 2001).

Um alto grau de diversidade também foi observado entre linhagens de *P. polymyxa* através de BOX-PCR quando comparado a resultados fenotípicos e homologia pelo gene *nif* (von der Weid et al., 2000). A mesma observação foi descrita entre linhagens de *P. azotofixans* isolados de milho (Seldin et al., 1998).

Entre isolados de *P. larvae* subsp. *larvae*, o BOX-PCR foi utilizado para fazer uma correlação entre os isolados provenientes da Argentina e de outros países, para se tentar descobrir a origem da doença provocada por esta espécie. Através da análise dos padrões de fragmentos foi sugerido que a doença na Argentina pode ter se originado de mais de uma fonte (Alippi & Aguilar, 1998).

O BOX-PCR também diferenciou com sucesso patovares de *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (Louws et al., 1994), linhagens de *Bradyrhizobium* (Vinuesa et al., 1998), isolados de *Burkholderia solanacearum*

(Smith et al. 1995) e isolados de *E. coli* provenientes de humanos e animais (Dombek et al. 2000).

#### **2.4 Fixação Biológica de Nitrogênio**

O nitrogênio é um dos principais constituintes das biomoléculas e, em sua forma molecular ( $N_2$ ), compõe quase 80% da atmosfera. Apesar de abundante, o nitrogênio do ar é quimicamente inerte e poucos são os organismos capazes de utilizá-lo. Determinadas bactérias utilizam como fonte de nitrogênio para o seu metabolismo, o enorme reservatório gasoso da atmosfera e estas possuem a capacidade de catalisar a redução do nitrogênio molecular à amônia e incorporar esse nitrogênio em suas moléculas orgânicas (aminoácidos e proteínas), processo denominado Fixação Biológica do Nitrogênio (Newton, 2000).

Essa capacidade é determinada pelo complexo enzimático da nitrogenase e as bactérias que a possuem são chamadas diazotróficas (fixadoras de nitrogênio). Até o homem conseguir realizar a fixação do nitrogênio industrialmente, as bactérias diazotróficas eram responsáveis pela fixação de cerca de 90% do nitrogênio do planeta, enriquecendo os oceanos e os solos com formas de nitrogênio assimiláveis pelas algas e plantas e, desta forma, sustentando toda a biosfera. Com o aumento explosivo da população humana no último século (passando de 1,6 bilhão, em 1990, para 6,1 bilhões de pessoas, em 2000) o homem passou a interferir significativamente nesta equação, colocando fertilizantes nitrogenados na lavoura para suprir a

crescente demanda de alimentos, de modo que hoje contribuimos com cerca de 25% do nitrogênio fixado no planeta (Newton, 2000).

O nitrogênio, por ser essencial, é freqüentemente limitante na produção agrícola. São muitos os processos envolvidos na ciclagem desse importante elemento: desnitrificação, volatilização da amônia, queimadas (processos que retornam o nitrogênio à forma gasosa) e lixiviação de nitratos para as camadas profundas do solo, conduzindo à perda do nitrogênio nos ecossistemas. Para repor o nitrogênio perdido são usados fertilizantes nitrogenados ou a Fixação Biológica de Nitrogênio (Neves & Rumjanek, 1998).

No entanto, o uso extensivo de fertilizantes nitrogenados na agricultura representa um problema econômico, social, ambiental e de saúde pública. Grande parte dos fertilizantes nitrogenados adicionados ao solo é consumida por bactérias (que voltam a oxidar o nitrogênio, liberando óxido nitroso e óxido nítrico na atmosfera) ou lixiviados, ou seja, não se aderem ao solo e acabam sendo levados pela água até o lençol freático. Contaminando o lençol freático, esse excesso de nitrogênio pode chegar em rios e lagoas e causar a eutroficação destes ambientes (Lewis et al., 1984).

Os microrganismos fixadores de nitrogênio são muito diversos, com representantes cultiváveis em todos os grupos filogenéticos de procariotos (Gram positivos, Gram negativos, Archea e Cianobactérias). Os genes de fixação de nitrogênio não são distribuídos entre todos os representantes relacionados filogeneticamente, isto é, os genes de fixação de nitrogênio são encontrados em diversos grupos filogenéticos, mas gêneros fixadores e não

fixadores podem estar em grupos fortemente relacionados (Affourtit et al., 2001).

Apesar da variedade de organismos capazes de fixar nitrogênio, o complexo da nitrogenase é muito similar na maioria destes. A nitrogenase é formada de duas proteínas sensíveis ao oxigênio. O componente I ou dinitrogenase é uma proteína ferro-molibdênio formada por duas subunidades. O componente II ou dinitrogenase redutase é uma proteína ferro-enxofre que transfere os elétrons para a dinitrogenase. Estas proteínas, juntamente com ATP,  $Mg^{+2}$ , e uma fonte de elétrons são essenciais para a atividade de fixação de nitrogênio (Moat & Foster, 1995).

Um ambiente anaeróbio é exigido para a atividade da nitrogenase devido à sensibilidade desta ao oxigênio, então uma hidrogenase acoplada a uma rota bioquímica que consome oxigênio ajuda a manter a anaerobiose do sistema. A fixação de nitrogênio é energeticamente muito dispendiosa e é inibida pela presença de nitrogênio fixado, principalmente amônia (Zehr et al., 2000).

O complexo da enzima nitrogenase, como visto anteriormente, é composto de duas proteínas conservadas: a proteína ferro-molibdênio, composta de subunidades codificadas pelos genes *nifD* e *nifK* e a proteína ferro codificada pelo gene *nifH*. O gene da proteína ferro, *nifH*, é um dos mais antigos genes funcionais da história da evolução e as relações entre as bactérias baseadas nas divergências de seqüências deste gene tem estado de acordo com a filogenia inferida pelas seqüências do gene 16S rRNA. Esta característica do gene *nifH* tem possibilitado o estudo da diversidade dos genes

de fixação de nitrogênio em bactérias de interesse bem como a caracterização de tais genes em comunidades microbianas do solo (Rosado et al., 1998).

Os genes *nifH*, *nifD* e *nifK* são normalmente encontrados juntos em um único operon e são fisicamente adjacentes a outros genes *nif* fazendo parte de um grande regulon. Frequentemente encontrados anteriores ao *nifK*, em um outro operon, estão os genes *nifE*, *nifN* e *nifX*. Os genes *nifE* e *nifN* codificam uma proteína cofator essencial para que o complexo da nitrogenase seja reunido. A função do *nifX* ainda não está clara, mas ele pode ter um papel na biossíntese de cofatores ou na regulação (Kessler et al., 1998). A expressão do gene *nif* exige o produto do gene *nifA*, um ativador transcricional deste regulon (Rudnick et al., 1997).

Recentemente, as seqüências do gene *nifH* têm sido amplificadas e sequenciadas de um grande número de ambientes, incluindo raízes de arroz, solos, oceanos e invertebrados (Zani et al., 2000). A amplificação do *nifH* pode fornecer informações sobre quais tipos de organismos podem estar envolvidos na fixação de N<sub>2</sub>, confirmando a presença dos genes em um determinado organismo que se espera ser fixador ou identificar a presença de organismos que são suspeitos de serem pequenos contribuidores na fixação de N<sub>2</sub> (Zehr et al., 1996).

Apesar do gene *nifH* ser evolutivamente conservado a nível de aminoácidos, ele pode não ser homólogo a nível de DNA devido a degeneração do código genético. Foi observado que em regiões de seqüências conservadas de aminoácidos, oligonucleotídeos iniciadores podem ser desenhados para amplificar uma seqüência de DNA alvo com alta especificidade. A



especificidade resulta da amplificação entre os oligonucleotídeos, devido à degeneração, não é aconselhável seu uso separadamente como sondas específicas. Este método possibilita clonar e sequenciar um gene de interesse sem a construção de uma biblioteca de DNA, produção de um anticorpo ou conhecimento prévio da seqüência de DNA (Zehr & McReynolds, 1989).

A reação em cadeia da polimerase é uma poderosa ferramenta para a investigação dos tipos e abundância de organismos fixadores de nitrogênio, e os fatores que limitam a sua distribuição e atividade. Se organismos fixadores de nitrogênio são detectados, o tipo de microrganismo pode ser identificado pelo sequenciamento dos fragmentos do gene *nifH* amplificados pelo PCR. A amplificação do *nifH* de culturas mistas de bactérias é possível através de oligonucleotídeos degenerados desenhados a partir de seqüências do *nifH* que codificam seqüências de aminoácidos altamente conservadas. Assim a amplificação é quase universal, e os resultados indicam que os sítios de anelamento não são seletivos para amostras específicas de *nifH* mesmo se eles variam no conteúdo de GC. Até mesmo seqüências *nifH* de arqueobactérias são amplificadas usando esses oligonucleotídeos, embora sejam somente distantemente relacionadas as seqüências *nifH* bacterianas. Estes oligonucleotídeos amplificam genes de organismos fixadores de nitrogênio associados com vários ambientes como oceanos, sedimentos, no picoplâncton e zooplâncton. A diversidade dos genes *nifH* no ambiente marinho é muito grande e com o desenvolvimento de novas ferramentas para a avaliação da expressão específica de genes *nifH*, haverá um melhor entendimento dos fatores controladores da fixação de nitrogênio (Zehr et al., 1996).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Meios de cultura e soluções**

Todos os meios de cultura e soluções utilizados na parte prática desta dissertação estão descritos nos Apêndices 9.1 a 9.4.

#### **3.2 Obtenção dos isolados bacterianos**

Os isolados bacterianos em forma de bastonete e produtores de esporos provenientes de amostras de água utilizados no presente trabalho pertencem à coleção do Departamento de Microbiologia/ICBS/UFRGS. São provenientes do estuário do Guaíba (Lami, Belém Novo e Ipanema/Porto Alegre), foram coletados nos anos de 1997, 1998 e 1999 e estão conservados em glicerol 15% a -20°C.

Os isolados de solo são provenientes de rizosfera de culturas de milho coletadas em Belém Novo (Porto Alegre/RS) e na fazenda Maribo em Osório (RS) nos meses de janeiro e fevereiro de 2002, respectivamente.

#### **3.3 Isolamento das amostras provenientes do solo (Seldin et al., 1983, Claus & Berkeley, 1986)**

As amostras de solo foram coletadas com o auxílio de um cano de PVC que foi inserido em uma profundidade de 10cm e o conteúdo transferido

para um frasco estéril. O solo coletado foi macerado e peneirado para a retirada de partículas grosseiras. A partir disso foi feita uma suspensão de 1g do macerado em água peptonada tamponada (Merck) (9.1.1) que foi submetida a um tratamento térmico a 80°C por 10 minutos para eliminar as formas bacterianas não esporuladas. Após o procedimento foram feitas diluições seriadas de  $10^0$  a  $10^{-4}$  que foram inoculadas, através da técnica de semeadura em superfície, em ágar tiamina-biotina (TB) (9.1.2) e ágar tripticaseína de soja (TSA) (Merck) (9.1.3). Aproximadamente 1ml das diluições também foram inoculadas em tubos contendo caldo lactosado (9.1.4) com tubos de Durhan invertidos e inseridos nestes.

Os tubos com caldo lactosado foram incubados a 30°C por 3 dias e os que apresentaram crescimento e produção de gás foram então inoculados, através da técnica de semeadura em superfície, em ágar vermelho neutro (9.1.5). As placas de ágar TB e ágar vermelho neutro foram incubadas anaerobicamente em jarros Gaspak com placas Anaerobac (Probac) a 30°C por 7 dias. As placas de ágar TSA foram incubadas aerobicamente a 30°C por no máximo 3 dias.

Após a incubação, as colônias foram purificadas através de repiques em placas de ágar TSA e incubadas aerobicamente a 30°C por 18-24 horas.

### **3.4 Identificação dos isolados bacterianos**

Os isolados de amostras de água que estavam congelados foram recuperados em caldo TSB e incubados por 18-24 horas a 30°C. Após o

crescimento foi feito um tratamento térmico para a eliminação das formas não esporuladas e estas foram inoculadas, através da técnica de semeadura em superfície, em placas contendo ágar TSA e incubadas por 24 horas a 30°C.

Primeiramente os isolados de água e de solo foram analisados quanto a morfologia celular e formação de esporos através de coloração de Gram e coloração de Endosporos para que posteriormente fossem submetidas a uma identificação por PCR para a amplificação do gene codificante da subunidade 16S rRNA para a identificação do gênero *Paenibacillus*.

### **3.5 Manutenção das culturas bacterianas**

Foram realizados repiques para a manutenção de culturas puras em placas e tubos contendo ágar TSA. Os isolados também foram mantidos conservados em glicerol 15% a -20°C.

### **3.6 Preparo dos isolados bacterianos para a extração de DNA total**

Para a extração de DNA total, cada isolado foi inoculado em balões volumétricos contendo 20ml de caldo TSB (Merck) (9.1.6) e incubados aerobicamente a 30°C por 18-24 horas sob agitação de 100rpm em um aparelho *shaker* Certomat BS-1 (B. Braun Biotech International).

### **3.7 Protocolo para extração de DNA total (modificado de Sambrook et al., 1989 e Alippi & Aguilar, 1998).**

Cerca de 2ml da cultura previamente crescida em caldo TSB (Merck) foi centrifugada a 15500g por 1 minuto em uma centrífuga Sigma 2K15 para a obtenção do precipitado de células. Esse foi ressuscitado em 700µl TES (9.2.1) e centrifugado por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 500µl de solução tampão TE (9.2.2). Seguiu-se a adição de 25µl de lisozima (20mg/ml) (Sigma) (9.2.3) e 15µl de RNase (10mg/ml) (Gibco-BRL) (9.2.4) que foram incubadas a 37° por 1 hora e em seguida a 60° por 15 minutos. As amostras foram esfriadas a temperatura ambiente e a estas adicionadas 108µl de uma solução 20% de dodecil sulfato de sódio (Synth) (9.2.5) e 19µl de proteinase K (20mg/ml) (Gibco-BRL) (9.2.6), e incubadas a 56°C por 15 minutos. Após o tempo de incubação, foi adicionado 1 volume de fenol (Invitrogen) (9.2.7) e centrifugado por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o procedimento repetido com fenol, duas vezes com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (9.2.8) e uma vez com clorofórmio/álcool isoamílico (9.2.9). O sobrenadante foi retirado para um tubo novo e adicionado 0,7 volumes de isopropanol e centrifugado por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 100µl de etanol 70%, seco em temperatura ambiente e ressuscitado em 50µl de TE2 (9.2.10).

### 3.8 Quantificação do DNA total (Sambrook et al., 1989)

Foi utilizada uma técnica rápida para estimar a quantidade de DNA em amostras: a fluorescência emitida pelo brometo de etídeo complexado com o DNA e vista sob luz ultravioleta. A quantidade de fluorescência é proporcional a massa total do DNA e por isso a quantidade de DNA na amostra pode ser estimada comparando a fluorescência produzida na amostra com aquela de uma série de padrões. Os padrões utilizados foram DNA lambda diluído nas seguintes concentrações: 500ng/ $\mu$ l, 250 ng/ $\mu$ l, 100 ng/ $\mu$ l e 50 ng/ $\mu$ l.

### 3.9 Identificação do gênero *Paenibacillus* pela amplificação do gene 16S rRNA

Linhagens pertencentes ao gênero *Paenibacillus* foram identificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) pelo uso dos oligonucleotídeos iniciadores PAEN515F (5'-TCGGAGAGTGACGGTACCTGA-3') (Shida et al., 1997a) e 1377R (5'-CATGCTGATCCGCGATTACTA-3') (Shida et al., 1996).

As reações de amplificação foram realizadas com uma concentração de DNA de aproximadamente 25ng num volume total de 20 $\mu$ l por reação contendo 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1x de tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 3,5mM de uma solução de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,125mM de uma solução de dNTPs (Amersham Biosciences) e 1,25 $\mu$ M de uma solução contendo os oligonucleotídeos iniciadores PAEN515 E 1377R (Gibco BRL).

A reação de amplificação foi realizada em um aparelho termociclador Progene (Techne) em um total de 27 ciclos nas seguintes condições: 1 ciclo

inicial de desnaturação a 94°C por 1 minuto, 25 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 58°C por 1,5 minuto, extensão a 72°C por 1,5 minuto e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

### **3.10 Análise do fragmento amplificado de *Paenibacillus***

O fragmento amplificado que identifica o gênero *Paenibacillus* tem 800bp e foi submetido a eletroforese com uma corrente de 75V por 20 minutos em um gel de agarose 0,8% (9.3.1) com tampão TAE 1X (9.3.3) corado com brometo de etídeo (9.3.2). O gel foi analisado sob luz ultravioleta e fotografado com câmera digital Kodak.

### **3.11 Identificação das espécies de *Paenibacillus***

A identificação das espécies de *Paenibacillus* foi realizada através de provas bioquímicas clássicas seguindo a tabela e a chave de identificação construídas a partir de dados bibliográficos especialmente para este trabalho (Tabela 3 e Figura 7).

As provas bioquímicas utilizadas neste trabalho foram: crescimento em anaerobiose, redução de nitrato, oxidase, produção de indol, produção de gás sulfídrico, produção de urease, fenilalanina desaminase, catalase, amilase e gelatinase; hidrólise de caseína e esculina; utilização do citrato, crescimento em 5% de cloreto de sódio, crescimento a 50°C, crescimento em pH 10,5, produção de gás a partir da glicose, fermentação de L- arabinose, D- frutose, galactose, D- glicose, lactose, manitol, maltose, D- rafinose, ramnose, D- ribose, salicina, sorbitol, D- trealose e D- xilose.

Os meios de cultura utilizados nos ensaios bioquímicos estão descritos nos Apêndices 9.1.7 a 9.1.19.

Foram utilizadas linhagens padrão como controles positivo e negativo para a realização dos testes bioquímicos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Linhagens padrão utilizadas como controles nos testes bioquímicos

<b>Linhagem</b>	<b>Procedência</b>
<i>Paenibacillus polymyxa</i> ATCC 842	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Paenibacillus alvei</i> ATCC 6344	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	LACEN
<i>Klebsiella spp.</i>	Dep. Microbiologia/ICBS/UFRGS

Todas as linhagens padrão foram cultivadas em caldo TSB.

### **3.12 Análise das sequências repetitivas BOX**

Os isolados do gênero *Paenibacillus*, foram submetidos a uma caracterização genética utilizando-se o oligonucleotídeo iniciador BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Alippi & Aguilar, 1998).

As reações de amplificação denominadas de BOX PCR foram realizadas com uma concentração de DNA de aproximadamente 100ng num volume total de 25µl por reação contendo 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1x de tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 3,5mM de uma solução de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 8ng/µl de uma solução de BSA (soro albumina bovina) (Amersham Biosciences), 0,5mM de uma solução de



dNTPs (Amersham Biosciences) e 5 $\mu$ M de uma solução contendo o oligonucleotídeo iniciador BOXA1R.

As reações de amplificação foram realizadas em um aparelho termociclador Progene (Techne) em um total de 32 ciclos nas seguintes condições: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1,5 minuto, extensão a 65°C por 5 minutos e 1 ciclo de extensão final a 65°C por 15 minutos.

### **3.13 Análise dos fragmentos amplificados através do BOX PCR**

Os fragmentos amplificados foram submetidos a eletroforese com uma corrente de 80V por 2 horas e 45 minutos em um gel de agarose 1% (9.3.1) (11cm de comprimento e 13cm de largura) com tampão TBE 0,5X (9.3.4) corado com brometo de etídeo (9.3.2). Os géis foram analisados sob luz ultravioleta e fotografado com câmera digital Kodak para posterior análise dos resultados.

### **3.14 Análise dos resultados do BOX PCR**

As análises do tamanho dos fragmentos amplificados foram feitas no programa KODAK 1D v.3.5.2, onde foram determinados os tamanhos moleculares, usando como padrão os fragmentos do DNA de fago Lambda clivado com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. As análises estatísticas e a construção dos dendrogramas foram feitas no programa SPSS 10.1, onde foram considerados 1 ou 0 para presença ou ausência de um determinado fragmento

de BOX-PCR. A similaridade entre estes foi avaliada pelo coeficiente de Dice, onde desconsidera-se a concordância 00 e atribui-se grande importância à concordância “positiva” 11. Esse coeficiente é muito adequado para comparar itens muito diversos, como diferentes espécies por exemplo, em que a probabilidade de detecção da presença de bandas comuns é menor. Os agrupamentos foram feitos por UPGMA (“Unweighted Pair Group Method Using Averages”), onde o critério para a formação dos grupos é a média das distâncias entre todos os pares de itens que formam cada grupo (Dias, 1998).

### 3.15 Amplificação do gene *nifH*

Os isolados de água e de solo identificados como sendo do gênero *Paenibacillus* foram submetidos ao PCR para a amplificação do gene *nifH*. Para isso, utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores degenerados NIFRR F (5'-TGYGAYCCNAARGCNGA-3') e NIFR R (5'-ADNGCCATCATYTCNCC-3') (Zehr & McReynolds, 1989).

As reações de amplificação foram realizadas com uma concentração de DNA de aproximadamente 50ng num volume total de 25 $\mu$ l por reação 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1x de tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 3mM de uma solução de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 8ng/ $\mu$ l de uma solução de BSA (soro albumina bovina) (Amersham Biosciences), 0,4mM de uma solução de dNTPs (Amersham Biosciences) e 5 $\mu$ M de uma solução contendo os oligonucleotídeos iniciadores NIF F e NIF R (Gibco BRL).

As reações de amplificação foram realizadas em um aparelho termociclador MiniCycler (MJ Research), em um total de 32 ciclos nas

seguintes condições: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 1 minuto; 15 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto, extensão a 70°C por 1,5 minuto; 15 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50,5°C por 1 minuto, extensão a 70°C por 1,5 minuto e 1 ciclo de extensão final a 70°C por 5 minutos.

### **3.16 Análise do fragmento amplificado do gene *nifH***

O fragmento amplificado do gene *nifH* foi submetido a eletroforese com uma corrente de 75V por 20 minutos em um gel de agarose 1% (9.3.1) com tampão TAE 1X (9.3.3) corado com brometo de etídeo (9.3.2). O gel foi analisado sob luz ultravioleta e fotografado com câmera digital Kodak.

### **3.17 Marcadores Moleculares**

Foi utilizado DNA de fago Lambda clivado com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* e clivado somente com a enzima *HindIII* como marcador de tamanho molecular para a análise dos fragmentos amplificados em gel de agarose.

### **3.18 Teste de Especificidade**

Para determinar a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores na detecção dos microrganismos alvo nas reações de amplificação do gênero *Paenibacillus* e do gene *nifH*, foram utilizadas amostras de DNA total de culturas puras como controles positivos e negativo. As linhagens utilizadas estão apresentadas na tabela 2.

**Tabela 2.** Linhagens padrão utilizadas nos ensaios de especificidade

<b>Linhagem</b>	<b>Procedência</b>
<i>Paenibacillus polymyxa</i> ATCC 842	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Paenibacillus alvei</i> ATCC 6344	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> SEMIA 249	FEPAGRO
<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 5052	FEPAGRO
<i>Bacillus licheniformis</i> LFB 576	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Bacillus megaterium</i> LFB 813	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Bacillus mycoides</i> LFB 445	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Bacillus cereus</i> CCT 0240	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Instituto Adolfo Lutz
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11105	Instituto Adolfo Lutz

Todas as linhagens padrão foram cultivadas em caldo TSB exceto as linhagens de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* que foram cultivadas em meio TY (9.1.20) e o DNA extraído conforme descrito no item 3.7.

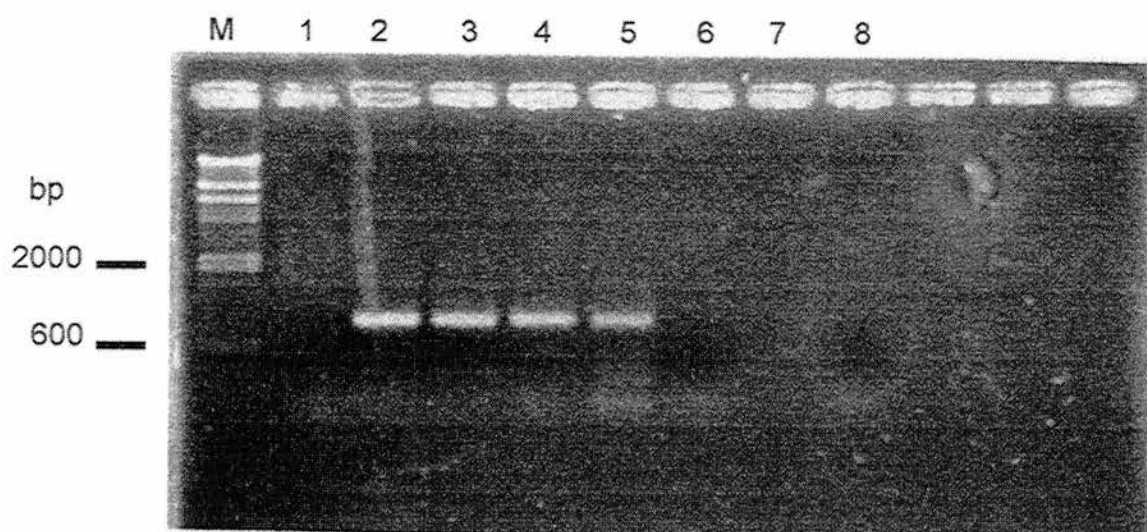
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Identificação dos isolados provenientes da água e do solo

#### 4.1.1 Identificação do gênero *Paenibacillus*

Foram isolados e identificados no total 80 bastonetes produtores de esporos provenientes de amostras de água dos balneários do Lami, Belém Novo e Ipanema em Porto Alegre. Estes foram submetidos ao PCR usando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para a amplificação do fragmento de 800bp de *Paenibacillus* (Figura 6). Trinta e cinco isolados foram identificados como pertencentes a esse gênero.

Os isolados do solo são provenientes de amostras de rizosfera de milho vindas de fazendas em Belém Novo/Porto Alegre e Osório. Ao total, 65 bastonetes produtores de esporos foram isolados e identificados. Estes foram submetidos a amplificação por PCR usando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para a identificação de *Paenibacillus*. Vinte e nove isolados foram identificados como pertencentes a esse gênero.



**Figura 6. Amplificação do fragmento de 800 bp de *Paenibacillus*.** Canaletas: M, Marcador Molecular DNA  $\lambda$  digerido com *Hind*III; 1, Controle Negativo *Bacillus cereus*; 2, Controle Positivo *Paenibacillus polymyxa*; 3-6 Isolados de Amostras de Água; 8, Controle Negativo da Reação.

#### 4.1.2 Identificação das espécies de *Paenibacillus*

O gênero *Paenibacillus* é constituído atualmente de trinta e oito espécies e uma subespécie. No presente trabalho, foram identificadas através de provas bioquímicas clássicas sessenta e quatro isolados. Tabelas e chaves de identificação foram construídas especialmente para este trabalho a partir de dados bibliográficos e apresentadas a seguir (Tabela 3 e Figura 7).

*P. alginolyticus*: Alexander & Priest, 1989, Shida et al., 1997a, Takeda et al., 2002 e Yoon et al., 2002.

*P. alvei*: Alexander & Priest, 1989, Bosshard et al., 2002, Djordjevic et al., 2000, Heyndrickx et al., 1995 e 1996b, Meehan et al., 2001, Nakamura, 1996, Pettersson et al., 1999 e Shida et al., 1997a.

***P. amylolyticus***: Alexander & Priest, 1989, Berge et al., 2002, Elo et al., 2001, Heyndrickx et al., 1996b, Meehan et al., 2001, Nakamura, 1984, Shida et al., 1997a e 1997b, van der Maarel et al., 2000.

***P. apiarius***: Meehan et al., 2001, Nakamura, 1996 e Pettersson et al., 1999.

***P. azoreducens***: Meehan et al., 2001.

***P. azotofixans***: Aguilera et al., 2001, Berge et al., 2002, Elo et al., 2001, Heyndrickx et al., 1996b, Meehan et al., 2001, Seldin et al., 1984, Shida et al., 1997a, von der Weid et al., 2002.

***P. borealis***: Elo et al., 2001 e von der Weid et al., 2002.

***P. brasilensis***: von der Weid et al., 2002.

***P. campinasensis***: Berge et al., 2002, Bosshard et al., 2002, Meehan et al., 2001 e Yoon et al., 1998.

***P. chibensis***: Berge et al., 2002, Elo et al., 2001, Meehan et al., 2001, Shida et al., 1997b e van der Maarel et al., 2000.

***P. chinjuensis***: Yoon et al., 2002.

***P. chondroitinus***: Alexander & Priest, 1989, Shida et al. 1997a e Yoon et al. 2002.

***P. curdlanolyticus***: Dasman et al., 2002, Kanzawa et al., 1995, Meehan et al., 2001, Pettersson et al., 1999 e Shida et al., 1997a.

***P. daejeonensis***: Lee et al., 2002.

***P. dendritiformis***: Bosshard et al., 2002, Meehan et al., 2001 e Tcherpakov et al., 1999.

***P. graminis* e *P. odorifer*:** Berge et al., 2002 e von der Weid et al., 2002.

***P. granivorans*:** van der Maarel et al., 2000.

***P. glucanolyticus*:** Alexander & Priest, 1989, Berge et al., 2002, Elo et al., 2001, Kanzawa et al., 1995, Meehan et al., 2001, Shida et al., 1997a e 1997b.

***P. glycanilyticus*:** Dasman et al., 2002.

***P. illinoisensis*:** Berge et al., 2002, Elo et al., 2001, Meehan et al., 2001 e Shida et al., 1997b.

***P. jamaicae*:** Aguilera et al., 2001 e Bosshard et al., 2002.

***P. kobensis*:** Dasman et al., 2002, Meehan et al., 2001, Pettersson et al., 1999 e Shida et al., 1997a.

***P. koleovorans*:** Takeda et al., 2002.

***P. koreensis*:** Bosshard et al., 2002, Chung et al., 2000, Meehan et al., 2001 e Takeda et al., 2002.

***P. larvae* subsp. *larvae* e *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*:** Heyndrickx et al., 1996a, 1996b e 1995, Meehan et al., 2001, Nakamura, 1996, Pettersson et al., 1999, Shida et al., 1997a e Takeda et al., 2002.

***P. lautus*:** Alexander & Priest, 1989, Berge et al., 2002, Elo et al., 2001, Meehan et al., 2001, Kanzawa et al., 1995, Nakamura, 1984, Shida et al., 1997a e 1997b.

***P. lentimorbus* e *P. popilliae*:** Meehan et al., 2001 e Pettersson et al., 1999.



***P. macerans***: Berge et al., 2002, Elo et al., 2001, Heyndrickx et al., 1996b, Meehan et al., 2001, Seldin et al., 1994, Shida et al., 1997a e von der Weid et al., 2002.

***P. macquariensis***: Berge et al., 2002, Elo et al., 2001, Heyndrickx et al., 1996b, Meehan et al., 2001, Shida et al., 1997a e 1997b.

***P. naphthalenovorans***: Daane et al., 2002.

***P. pabuli***: Alexander & Priest, 1989, Berge et al., 2002, Bosshard et al., 2002, Daane et al., 2002, Elo et al., 2001, Heyndrickx et al., 1996b, Meehan et al., 2001, Nakamura, 1984 e Shida et al., 1997a.

***P. peoriae***: Aguilera et al., 2001, Berge et al., 2002, Elo et al., 2001, Heyndrickx et al., 1996b, Meehan et al., 2001, Shida et al., 1997a e von der Weid et al., 2002.

***P. polymyxa***: Aguilera et al., 2001, Berge et al., 2002, Bosshard et al., 2002, Daane et al., 2002, Dasman et al., 2002, Elo et al., 2001, Heyndrickx et al., 1996b, Meehan et al., 2001, Seldin et al., 1983, Shida et al., 1997a e von der Weid et al., 2002.

***P. turicensis***: Bosshard et al., 2002.

***P. thiaminolyticus***: Bosshard et al., 2002, Meehan et al., 2001, Nakamura, 1996, Pettersson et al., 1999, Shida et al., 1997a, Tcherpakov et al., 1999 e van der Maarel et al., 2000.

***P. validus***: Alexander & Priest, 1989, Daane et al., 2002, Heyndrickx et al., 1995 e 1996b, Meehan et al., 2001, Nakamura, 1984, Shida et al., 1997a e Yoon et al., 2002.





Tabela 3. Características fenotípicas das espécies e subespécies do gênero *Paenibacillus* (continuação)

Testes bioquímicos	<i>P. glaucanolyticus</i>	<i>P. thiaminolyticus</i>	<i>P. polymyxa</i>	<i>P. peoriae</i>	<i>P. macerans</i>	<i>P. lautus</i>	<i>P. amylolyticus</i>	<i>P. apiiarius</i>	<i>P. illinoisensis</i>	<i>P. koreensis</i>	<i>P. jamilae</i>	<i>P. graminis</i>	<i>P. odorifer</i>	<i>P. brasiliensis</i>	<i>P. campinasensis</i>	<i>P. larvae subsp. larvae</i>	<i>P. larvae subsp. pulvifaciens</i>	<i>P. azotofixans</i>	<i>P. macquariensis</i>	<i>P. pabuli</i>	<i>P. alvei</i>
Alantoína	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
D- arabinose	nd	nd	nd	nd	+	+	-	nd	nd	nd	+	+	-	-	nd	+	-	nd	+	+	+
L- arabinose	V	V	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D- arabitól	-	nd	-	-	V	-	-	nd	-	nd	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-
L- arabitól	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	nd	-	-	nd	nd	nd	nd
Arbutina	+	nd	+	+	+	+	-	nd	nd	nd	+	+	-	-	-	-	V	nd	+	+	+
Carboximetil celulose	+	nd	nd	nd	nd	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+
Celobiose	+	nd	+	+	+	+	-	+	nd	nd	+	+	-	-	-	-	V	nd	+	+	+
2- ceto- gluconato	V	nd	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	nd	-	-	nd	nd	nd	nd
5- ceto- gluconato	nd	nd	V	-	V	-	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	nd	-	-	nd	nd	nd	nd
Curdiano	+	nd	nd	nd	nd	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+
Dulcitol	-	nd	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	nd	-	-	nd	-	-	-
Elastina	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Eritritol	-	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	nd	-	-	nd	nd	nd	nd
D- frutose	+	nd	+	+	+	+	+	-	+	nd	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
D- fucose	-	nd	-	-	-	-	-	nd	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L- fucose	+	nd	-	-	+	V	+	nd	+	nd	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	V	-	+	+	+	-
B- gentiobiose	nd	nd	+	+	+	+	nd	nd	nd	nd	V	+	+	V	-	-	+	+	+	+	+
Glicerol	+	-	+	V	+	+	-	-	+	nd	+	+	V	-	nd	+	+	-	+	+	+
Glicogênio	nd	nd	+	+	+	+	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-



Tabela 3. Características fenotípicas das espécies e subespécies do gênero *Paenibacillus* (continuação)

Testes bioquímicos	<i>P. glaucanolyticus</i>	<i>P. thiaminolyticus</i>	<i>P. polymyxa</i>	<i>P. peoriae</i>	<i>P. macerans</i>	<i>P. lautus</i>	<i>P. amylolyticus</i>	<i>P. apiarius</i>	<i>P. illinoisensis</i>	<i>P. korensis</i>	<i>P. jamilae</i>	<i>P. graminis</i>	<i>P. odorifer</i>	<i>P. brasiliensis</i>	<i>P. campinasensis</i>	<i>P. larvae subsp. larvae</i>	<i>P. larvae subsp. pulverificans</i>	<i>P. azotofixans</i>	<i>P. macquariensis</i>	<i>P. pabuli</i>	<i>P. alvei</i>
Pectina	-	-	+	+	-	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	-
Pululano	+	+	+	+	V	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	+
Pustulano	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Quitina	-	+	-	-	+	nd	nd	-	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D- rafinose	+	nd	+	V	+	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Ramnose	-	nd	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V
Sorbitol	-	nd	+	-	V	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V
L- sorbose	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D- tagatose	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D- trealose	+	nd	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V
D- turanose	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Xilitol	+	nd	-	-	-	-	-	+	+	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D- xilose	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
L- xilose	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
Litmus milk	nd	-	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Voges-Proskauer	-	-	+	+	-	-	-	-	nd	-	+	+	+	+	+	V	V	+	+	-	-

**Tabela 3.** Características fenotípicas das espécies e subespécies do gênero *Paenibacillus* (continuação)

Testes bioquímicos	<i>P. azoreducens</i>	<i>P. dendritiformis</i>	<i>P. chinjunsis</i>	<i>P. curdianolyticus</i>	<i>P. kobensis</i>	<i>P. validus</i>	<i>P. chibensis</i>	<i>P. alginolyticus</i>	<i>P. chondroitinus</i>	<i>P. lentimorbus</i>	<i>P. popilliae</i>	<i>P. borealis</i>	<i>P. naphthalenovorans</i>	<i>P. koleovorans</i>	<i>P. granivorans</i>	<i>P. glycanilyticus</i>	<i>P. turicensis</i>	<i>P. daejeonensis</i>
Anaerobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Redução de nitrato	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	+	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caseína	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Uréia	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	nd	nd	+	-	nd	nd	+	-
Citrato	-	-	nd	-	-	-	-	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-
Cresc. 50°C	+	nd	nd	-	-	+	+	-	-	-	-	nd	nd	-	-	-	-	-
Cresc. 10°C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cresc. 5°C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cresc. 2% NaCl	-	+	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-
Cresc. 5% NaCl	+	+	+	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cresc. pH 5,7	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+
Tirosina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	+	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lecitina	nd	w	nd	nd	nd	nd	nd	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Alginato	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	nd	-	nd	-	-	V	nd	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Tabela 3. Características fenotípicas das espécies e subespécies do gênero *Paenibacillus* (continuação)

Testes bioquímicos	<i>P. azoreducens</i>	<i>P. dendritiformis</i>	<i>P. chinjensis</i>	<i>P. curdianolyticus</i>	<i>P. kobensis</i>	<i>P. validus</i>	<i>P. chibensis</i>	<i>P. alginolyticus</i>	<i>P. chondroitinus</i>	<i>P. lentimorus</i>	<i>P. popilliae</i>	<i>P. borealis</i>	<i>P. naphthalenovorans</i>	<i>P. koleovorans</i>	<i>P. granivorans</i>	<i>P. glycanilyticus</i>	<i>P. turicensis</i>	<i>P. daejeonensis</i>
Naftaleno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd
Benzoato	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd
Sheat	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd
L-ácido málico	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
D-ácido málico	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
L-ácido láctico	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
Acetato	nd	+	nd	nd	nd	+	-	+	V	nd	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	w
Propionato	nd		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	-	nd	nd	-
Fumarato	nd	+	nd	nd	nd	+	nd	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Malato	nd	+	nd	nd	nd	+	nd	+	V	nd	nd		nd	nd	nd	nd	nd	nd
Succinato	nd	+	nd	nd	nd	+	nd	+	-	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	-
Piruvato	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	-
L- alanina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Arginina	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd
Ornitina	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	+	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd
Lisina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	-	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd
L- aspartato	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
L- leucina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cresc. Tween 40	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cresc. Tween 80	nd	-	nd	nd	nd	-	nd	+	+	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	-
Prod. Gás glicose	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	nd	nd	nd	+	-	nd	-	nd	nd	nd



**Tabela 3.** Características fenotípicas das espécies e subespécies do gênero *Paenibacillus* (continuação)

Testes bioquímicos	<i>P. azoreducens</i>	<i>P. dendritiformis</i>	<i>P. chinjuensis</i>	<i>P. curdianolyticus</i>	<i>P. kobensis</i>	<i>P. validus</i>	<i>P. chibensis</i>	<i>P. alginolyticus</i>	<i>P. chondroitinus</i>	<i>P. lentimorbus</i>	<i>P. popilliae</i>	<i>P. borealis</i>	<i>P. naphthalenovorans</i>	<i>P. koleovorans</i>	<i>P. granivorans</i>	<i>P. glycanilyticus</i>	<i>P. turicensis</i>	<i>P. daejeonensis</i>
Adonitol	-	nd	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	nd	-	-	nd
Amidalina	nd	nd	nd	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	nd	+	+	+
D- arabinose	nd	nd	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	-	-	nd
L- arabinose	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
D- arabitol	nd	nd	nd	-	-	V	-	nd	nd	nd	nd	+	-	-	nd	-	nd	nd
L- arabitol	nd	nd	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	nd	-	nd	nd
Arbutina	nd	+	nd	+	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	+	-	-	nd	+	+	nd
Carboximetil celulose	nd	nd	nd	nd	-	+	nd	+	+	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	+	nd
Celobiose	+	+	+	+	+	-	nd	+	+	nd	nd	+	-	V	nd	+	+	w
2- ceto- gluconato	nd	nd	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	nd	nd
5- ceto- gluconato	nd	nd	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	w	nd	-	nd	nd
Curdlano	nd	nd	nd	+	+	-	nd	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Dulcitol	nd	nd	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	nd	-	nd	nd
Elastina	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Eritritol	nd	nd	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	nd	nd
D- frutose	+	-	-	+	+	+	+	+	+	nd	nd	+	V	nd	nd	+	+	-
D- fucose	nd	nd	nd	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	-	nd	-	nd	nd
L- fucose	nd	nd	nd	-	-	-	+	nd	nd	nd	nd	-	-	-	nd	+	-	nd
Galactose	+	-	nd	-	-	+	+	+	+	+	nd	+	+	-	nd	+	+	w
B- gentibiose	nd	nd	nd	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	+	-	-	nd	+	+	+
Glicerol	+	nd	-	+	-	+	-	nd	nd	nd	nd	+	-	-	nd	+	-	+

Tabela 3. Características fenotípicas das espécies e subespécies do gênero *Paenibacillus* (continuação)

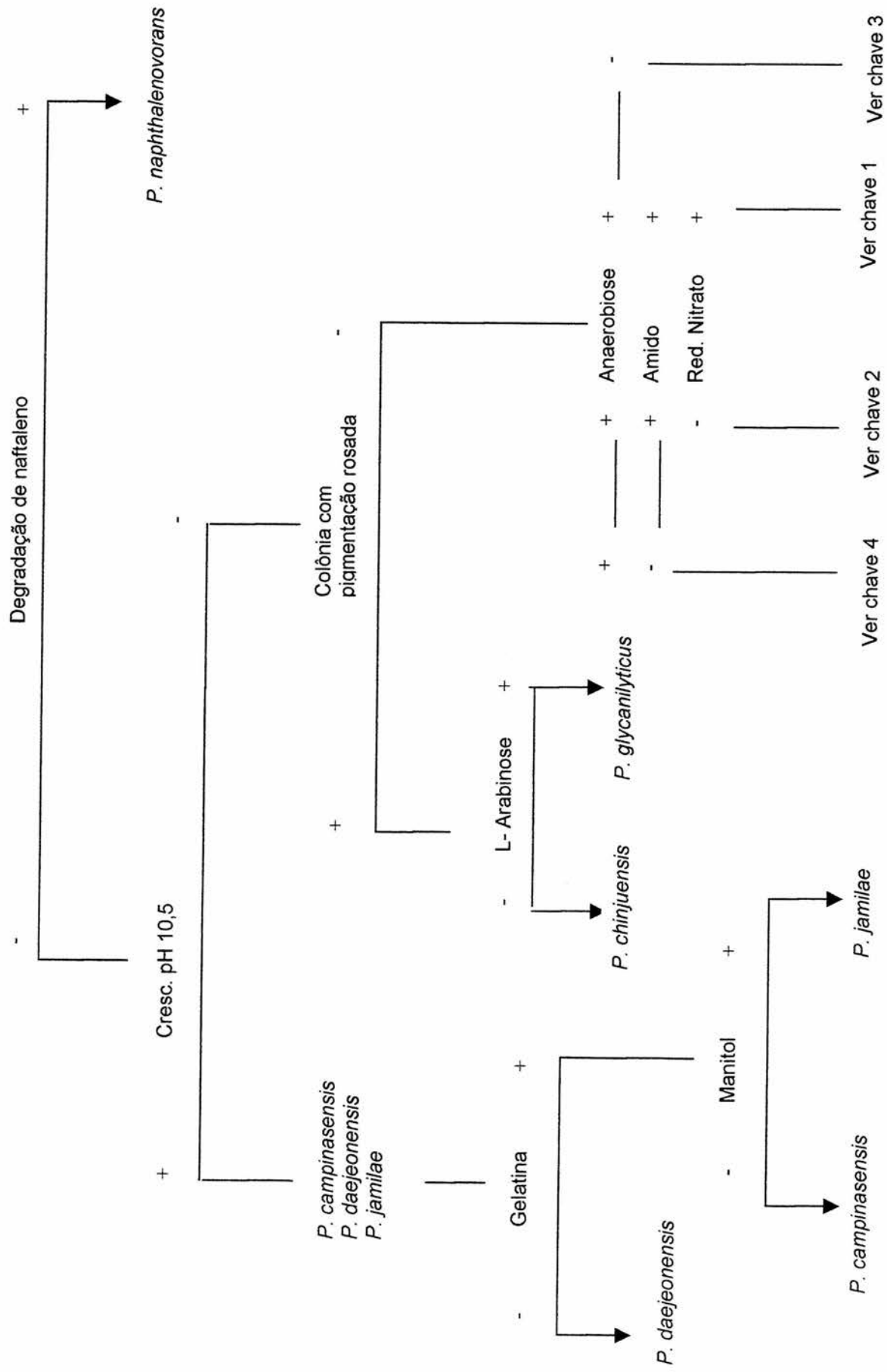
Testes bioquímicos	<i>P. azoreducens</i>	<i>P. dendritiformis</i>	<i>P. chinjuensis</i>	<i>P. curdianolyticus</i>	<i>P. kobensis</i>	<i>P. validus</i>	<i>P. chibensis</i>	<i>P. alginoilyticus</i>	<i>P. chondroitinus</i>	<i>P. lentimorbus</i>	<i>P. popilliae</i>	<i>P. borealis</i>	<i>P. naphthalenovorans</i>	<i>P. koleovorans</i>	<i>P. granivorans</i>	<i>P. glycanilyticus</i>	<i>P. turicensis</i>	<i>P. daejeonensis</i>	
Glicogênio	nd	nd	nd	+	+	∇	nd	nd	nd	nd	nd	+	-	-	nd	+	+	+	
D- glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gluconato	nd	nd	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	+	-	-	nd	-	-	-	-
Hipoxantina	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Inositol	-	nd	nd	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	nd	+	-	-	-
Inulina	+	nd	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	nd	-	-	-	-
Lactose	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactulose	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
D- lioxose	nd	nd	nd	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	V	-	-	nd	-	nd	nd	nd
D- manitol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Manitol	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	nd	+	-	-	+	+	+	+
D- manose	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	nd	+	+	nd	nd	+	+	+	+
Maltose	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	nd	nd	+	+	+	+
Maltotriose	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Melezitose	+	nd	nd	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Melibiose	+	nd	nd	-	-	+	nd	+	+	+	nd	nd	V	-	nd	+	+	+	+
α- metil D- galactosídeo	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	w	nd
α- metil D- glicosídeo	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	nd	V	V	-	+	+	+	-	nd
α- metil D- manosídeo	nd	nd	nd	+	-	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	-	+	+	-	-	nd
B- metil D- galactosídeo	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+
B- metil D- xilosídeo	nd	nd	nd	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

Tabela 3. Características fenotípicas das espécies e subespécies do gênero *Paenibacillus* (continuação)

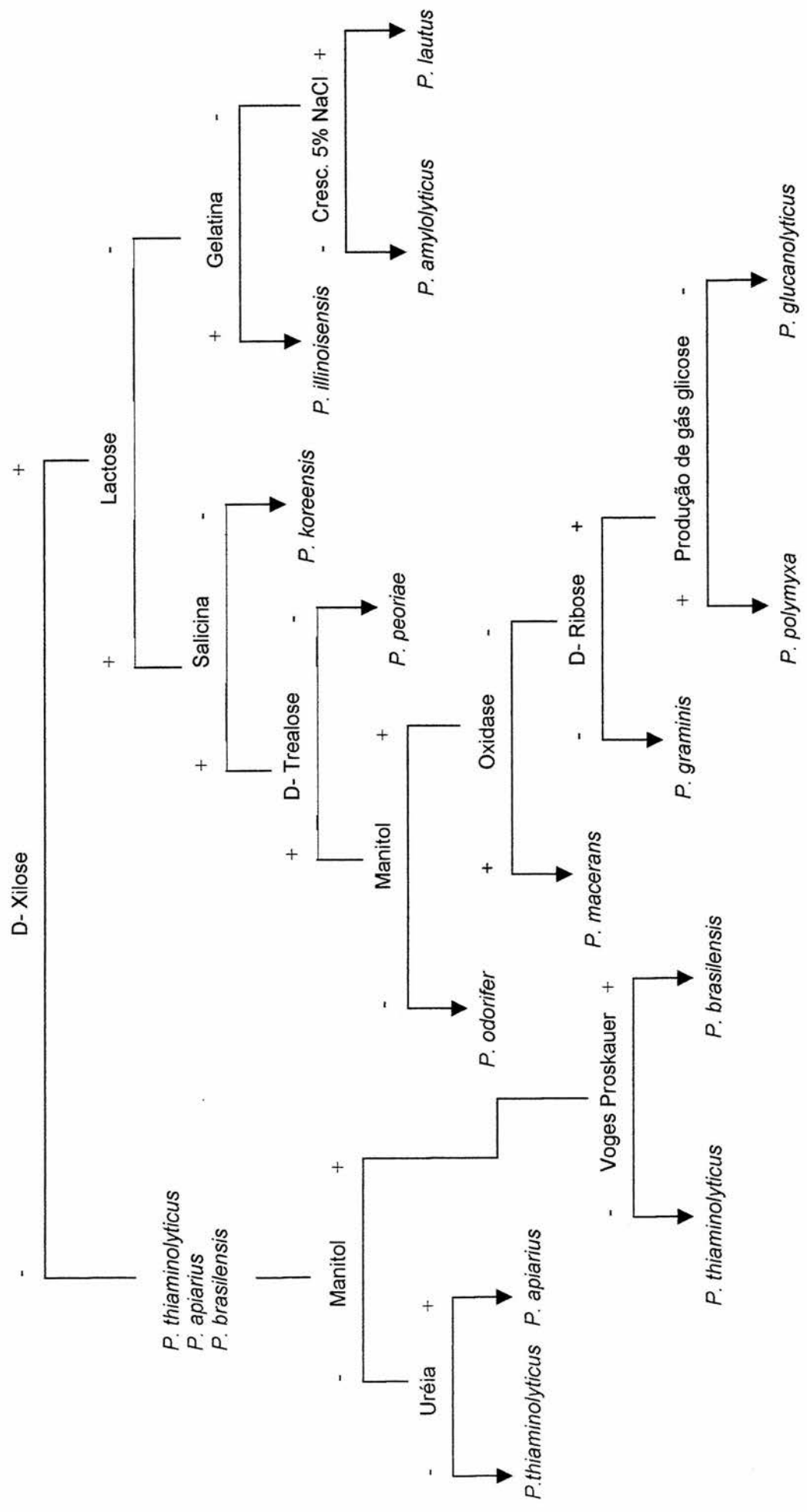
Testes bioquímicos	<i>P. azoreducens</i>	<i>P. dendritiformis</i>	<i>P. chinjunsensis</i>	<i>P. curdianolyticus</i>	<i>P. kobensis</i>	<i>P. validus</i>	<i>P. chibensis</i>	<i>P. alginolyticus</i>	<i>P. chondroitinus</i>	<i>P. lentimorbus</i>	<i>P. popilliae</i>	<i>P. borealis</i>	<i>P. naphthalenovorans</i>	<i>P. koleovorans</i>	<i>P. granivorans</i>	<i>P. glycanilyticus</i>	<i>P. turicensis</i>	<i>P. daejeonensis</i>	
N-acetil glicosamina	nd	nd	nd	+	+	-	-	nd	nd	nd	nd	+	-	nd	+	+	+	-	
Palatinose	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pectina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pululano	nd	nd	nd	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Quitina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
D-rafinoose	nd	nd	-	+	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	+	+	+	+	+	+
Ramnose	-	nd	-	-	-	+	-	+	+	nd	nd	-	-	nd	nd	+	nd	nd	nd
Ribose	+	nd	+	-	-	+	+	+	+	nd	nd	-	-	nd	nd	+	+	+	+
Sacarose	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	nd	nd	+	+	nd	nd	+	+	+	+
Salicina	nd	nd	-	+	+	-	+	+	+	nd	nd	+	-	nd	nd	+	+	+	+
Sorbitol	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	V	-	nd	nd	-	-	-	-
L-sorbose	-	nd	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	V	-	nd	-	-	-	-
D-tagatose	nd	nd	nd	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	nd	-	-	-	-
D-trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	+	+
D-turanose	nd	nd	nd	+	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	+	V	-	nd	+	+	+	+
Xantina	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Xilitol	nd	nd	nd	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	V	V	-	nd	-	-	-	-
D-xilose	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
L-xilose	nd	nd	nd	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	nd
ONPG	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Litmus milk	+	-	nd	nd	nd	nd	-	-	-	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

<sup>a</sup> +, reação positiva; -, reação negativa; V, reação variável; w, reação fracamente positiva; nd, não determinado para esta espécie

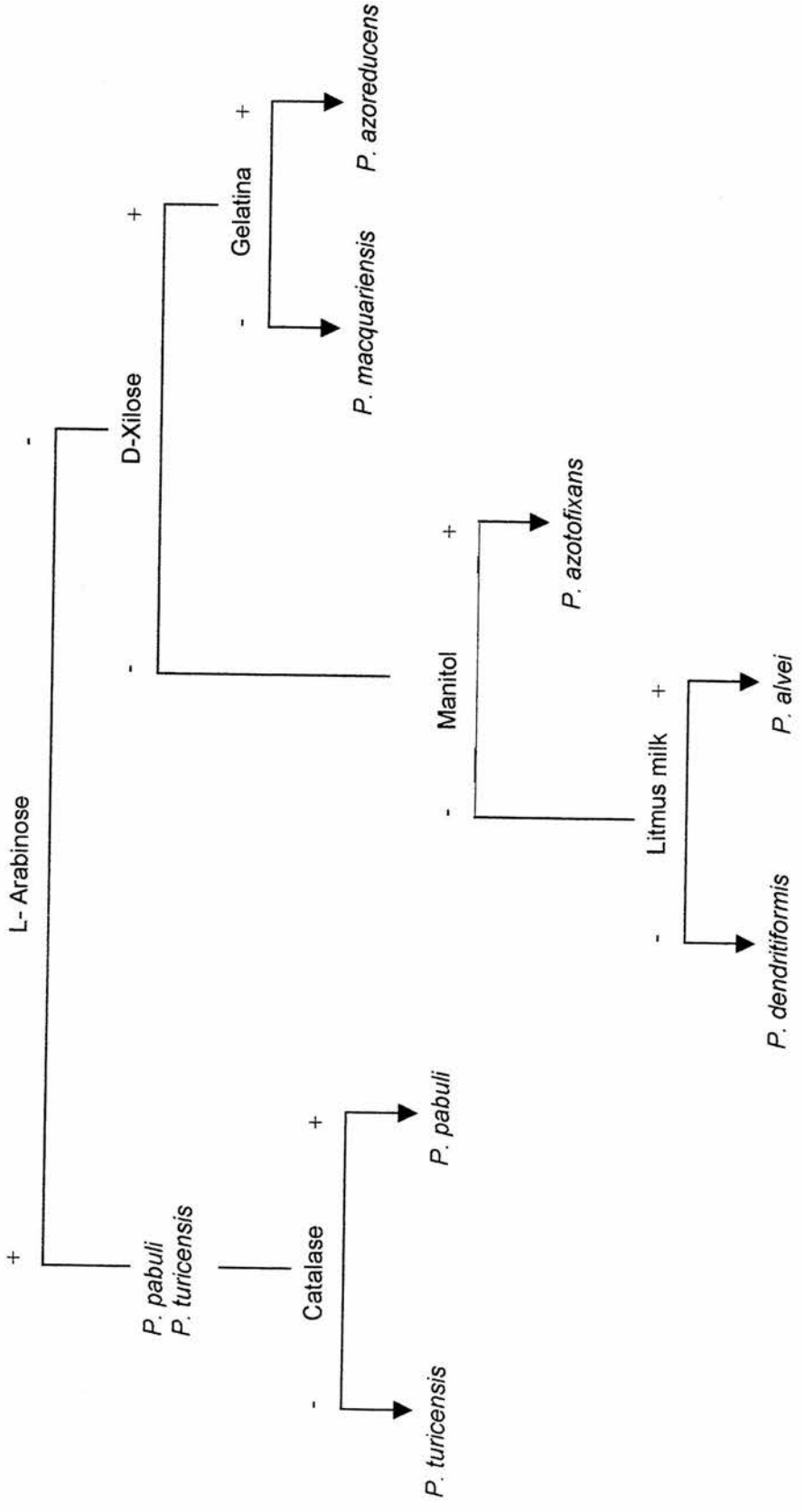
Figura 7. Chave de Identificação das espécies do gênero *Paenibacillus*



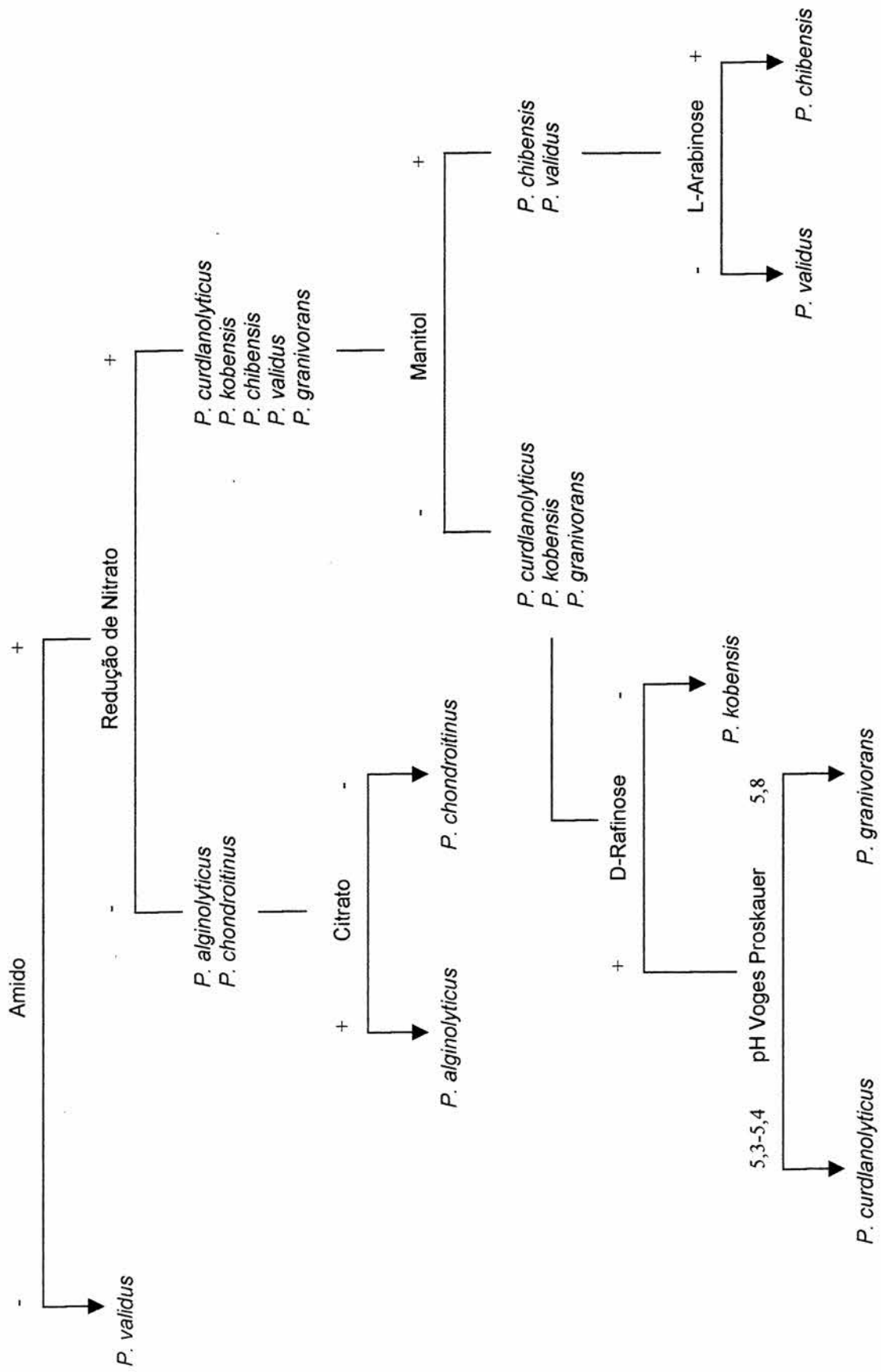
### Chave de Identificação 1



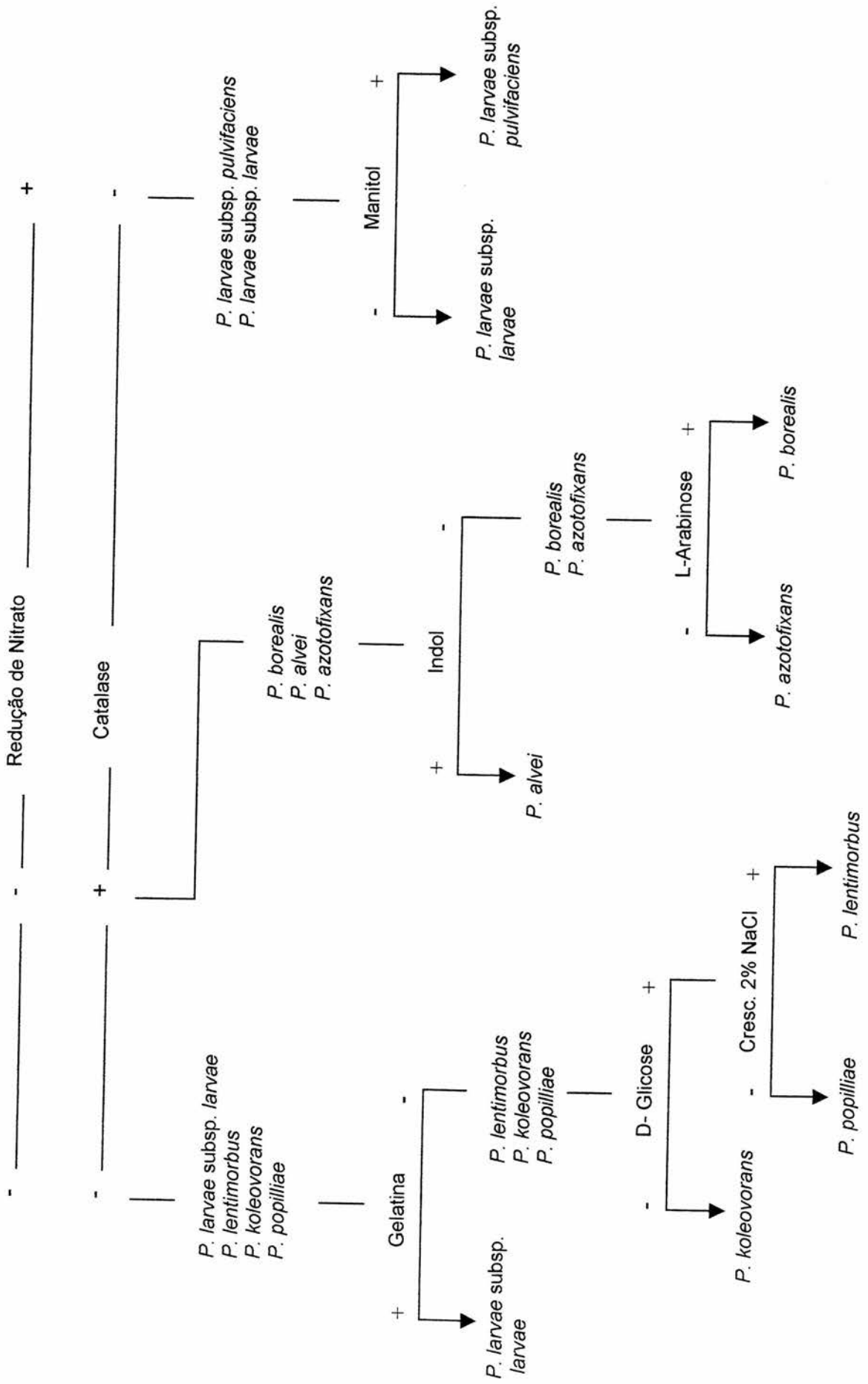
### Chave de Identificação 2



### Chave de Identificação 3



### Chave de Identificação 4





De acordo com a Tabela 4, as espécies mais freqüentemente encontradas nas amostras provenientes da água foram: *P. validus*, *P. azotofixans*, *P. chibensis*, *P. glucanolyticus* e *P. illinoisensis*. Nas amostras provenientes de solo as espécies mais encontradas foram: *P. alginolyticus*, *P. pabuli* e *P. validus*.

Cerca de 37% dos isolados de água foram identificados como espécies fixadoras de nitrogênio (*P. azotofixans*, *P. brasilensis*, *P. borealis*, *P. odorifer*, *P. graminis* e *P. macerans*) contra 14% dos isolados do solo (*P. azotofixans* e *P. peoriae*).

**Tabela 4.** Identificação das espécies de *Paenibacillus* isoladas de amostras de água e de solo

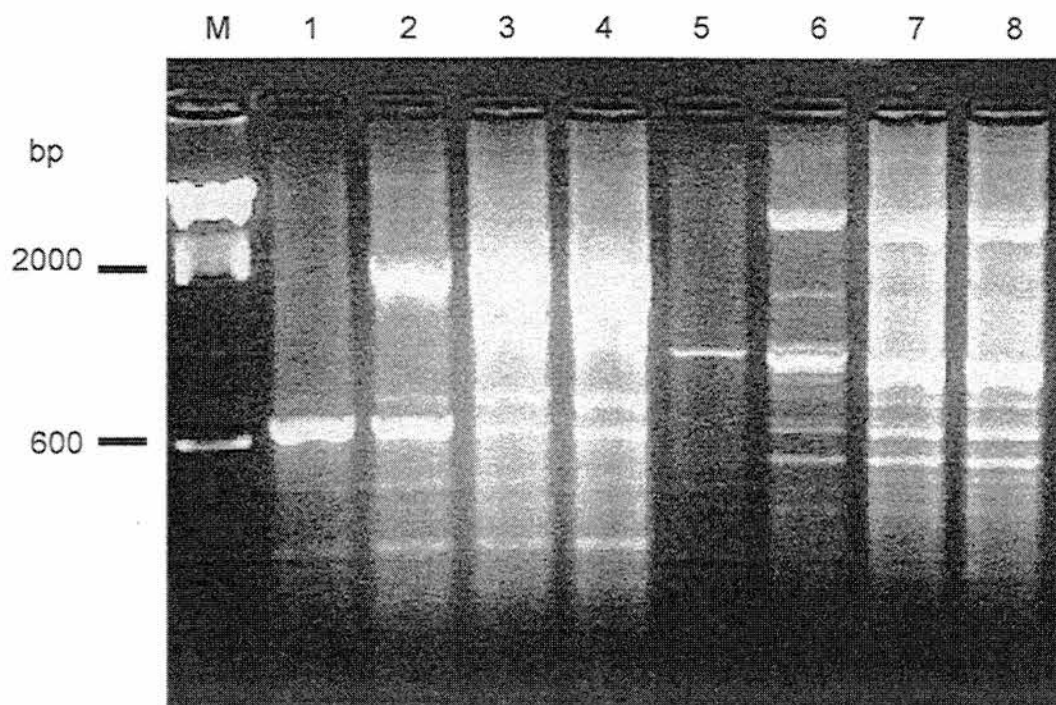
<b>Espécie</b>	<b>Isolados de água</b>	<b>Isolados de solo</b>
<i>P. validus</i>	8	4
<i>P. alginolyticus</i>	0	7
<i>P. azotofixans</i>	6	3
<i>P. chibensis</i>	3	2
<i>P. glucanolyticus</i>	3	2
<i>P. illinoisensis</i>	3	0
<i>P. koreensis</i>	2	0
<i>P. brasilensis</i>	2	0
<i>P. borealis</i>	2	0
<i>P. thiaminolyticus</i>	1	2
<i>P. odorifer</i>	1	0
<i>P. graminis</i>	1	0
<i>P. macerans</i>	1	0
<i>P. pabuli</i>	1	5
<i>P. apiarius</i>	1	2
<i>P. macquariensis</i>	0	1
<i>P. peoriae</i>	0	1
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>29</b>

## 4.2 Padronização das condições do BOX-PCR

A técnica de BOX-PCR precisa ser muito bem padronizada quanto aos reagentes utilizados e suas concentrações devido ao seu alto poder discriminatório e alta sensibilidade.

### 4.2.1 Concentração de Cloreto de Magnésio ( $MgCl_2$ )

O cloreto de magnésio é necessário para a atividade da enzima *Taq* DNA polimerase. Para a determinação da concentração ideal para a realização do BOX-PCR foram testadas as concentrações de 2, 2,5, 3, 3,5 e 4mM de  $MgCl_2$ . A concentração escolhida foi de 3.5 mM de  $MgCl_2$ , a qual produziu um padrão de fragmentos, ideal para posterior análise e construção dos dendrogramas (Figura 8).



**Figura 8.** Teste de concentração de  $MgCl_2$ . Canaletas: M, Marcador Molecular DNA  $\lambda$  clivado com *Hind*III; 1-4, *Paenibacillus polymyxa* nas seguintes concentrações 2, 2,5, 3,5 e 4mM; 5-8 *Paenibacillus alvei* nas seguintes concentrações 2, 2,5, 3,5 e 4mM.

#### 4.2.2 Concentração de DNA molde

Foram testadas as concentrações de 200, 150, 100 e 50ng/ $\mu$ l de DNA molde para o BOX-PCR. A concentração de 100ng/ $\mu$ l foi a que se mostrou mais eficiente para a produção e reprodutibilidade do perfil de fragmentos nos isolados de *Paenibacillus* (Figura 9).

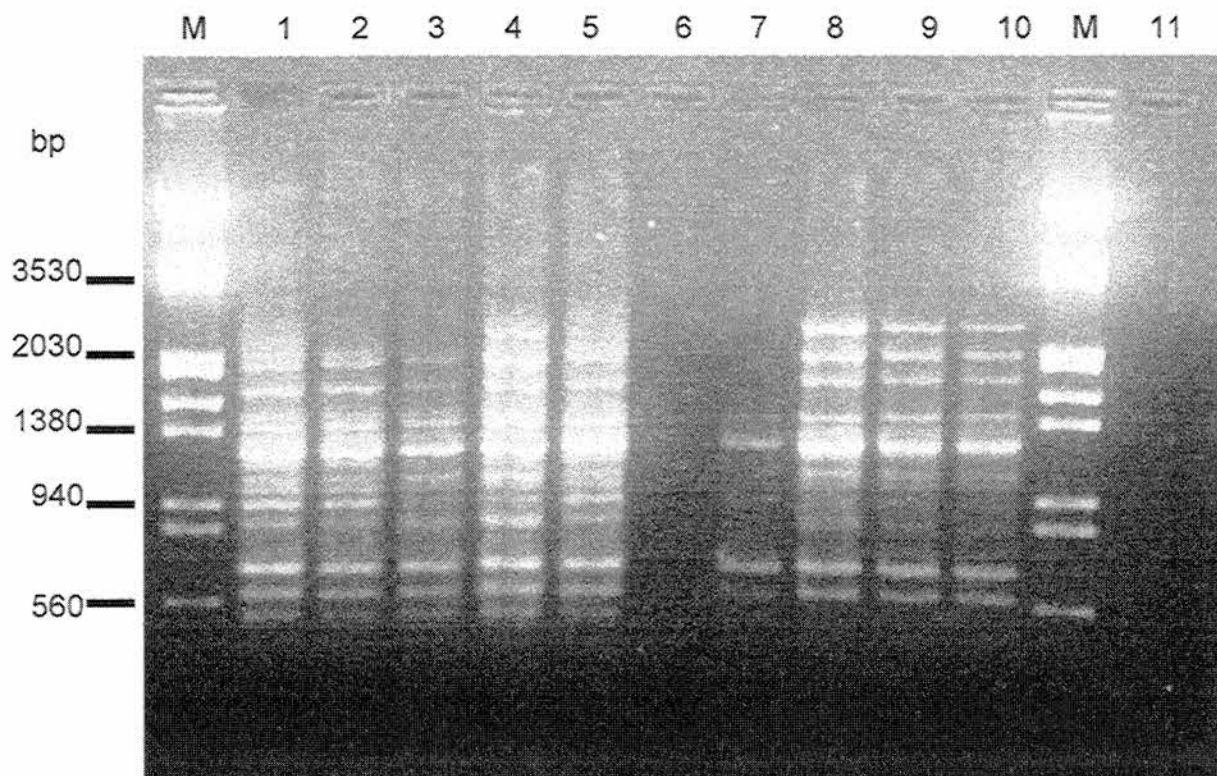


Figura 9. Teste de concentração de DNA. Canaletas: M, Marcador Molecular DNA  $\lambda$  clivado com *EcoRI* e *HindIII*; 1-2 *P. validus* nas concentrações de 150 e 100ng/ $\mu$ l de DNA; 3-4 *P. validus* nas concentrações de 50 e 100ng/ $\mu$ l de DNA; ; 5-7 *P. chibensis* nas concentrações de 200, 150 e 100ng/ $\mu$ l de DNA; 8-10 *P. chibensis* nas concentrações de 200, 150 e 100ng/ $\mu$ l de DNA; 11, Controle Negativo da reação.

#### **4.2.3 Concentração do oligonucleotídeo iniciador BOXA1R**

A concentração inicial recomendada pelo protocolo de Alippi & Aguilar (1998) para as reações de amplificação é de 2,5 $\mu$ M de BOXA1R. Foram testadas as concentrações de 2,5 e 5 $\mu$ M do oligonucleotídeo iniciador. Foi feita a padronização da concentração levando-se em consideração o número de bandas obtidas bem como a intensidade das mesmas. A concentração de 5 $\mu$ M apresentou bandas mais fortes e definidas e mostrou ser a mais eficiente para os isolados de *Paenibacillus*, quando comparada com a de 2,5 $\mu$ M.

#### **4.2.4 Concentração de BSA**

O BSA ("Bovine Serum Albumin") foi utilizado para reduzir os efeitos inibitórios de contaminantes tais como ácido húmico, FeCl<sub>3</sub>, ácido fúlvico, etc... Utilizou-se a concentração de 8ng/ $\mu$ l de BSA no preparo das amostras para as reações de amplificação (Wintzingerode et al., 1997).

#### **4.2.5 Temperatura e número de ciclos**

O protocolo definido por Alippi & Aguilar (1998) recomenda 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 7 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 53°C por 1 minuto, extensão a 65°C por 8 minutos e uma extensão final a 65°C por 15 minutos. Neste trabalho obteve-se um melhor resultado ajustando-se o tempo e a temperatura de anelamento e de desnaturação inicial e diminuindo-se o tempo de extensão. Com isso obteve-se uma maior exposição da fita molde de DNA ao oligonucleotídeo iniciador. Portanto, foram utilizados 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos,

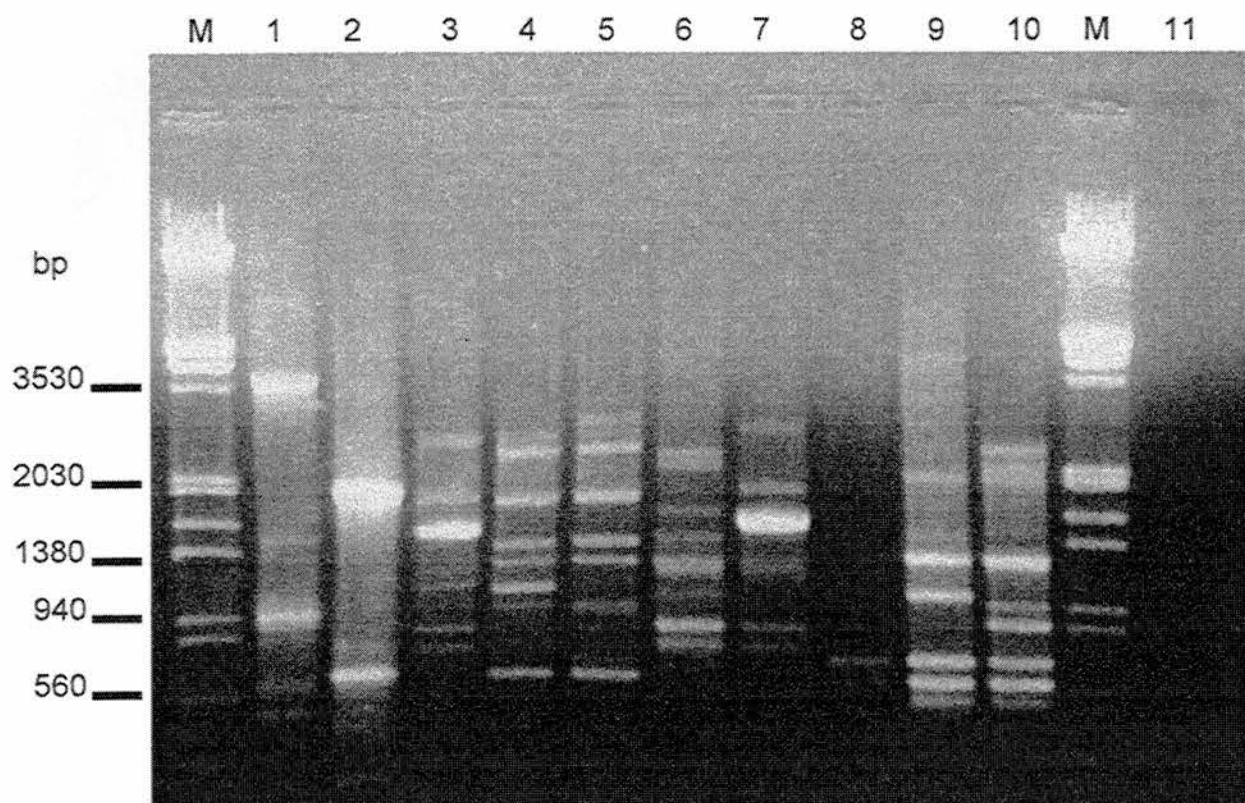
30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1,5 minuto, extensão a 65°C por 5 minutos e um ciclo de extensão final a 65°C por 15 minutos.

#### **4.3 Perfil de BOX-PCR**

Foram encontrados 28 perfis entre as diferentes espécies isoladas da água enquanto que no solo foram encontrados 18 perfis de BOX-PCR (Figura 10).

Para as análises foram selecionados quarenta e três fragmentos com tamanho molecular variando de 4365 a 445bp. Os isolados de água amplificaram de 5-13 fragmentos com uma média de 9,3 fragmentos por isolado, enquanto que os do solo amplificaram de 5-16 fragmentos com uma média de 9,5 fragmentos por isolado. Observou-se fragmentos de 1230, 841, 715 e 618bp comuns a maioria dos isolados de água que foram amplificados. Entre os isolados de solo foram encontrados fragmentos comuns de 2378, 1645, 1457, 1359, 1259, 1122, 1087 e 954bp. Não foi observada a ocorrência de um mesmo fragmento para todos os isolados.

Os fragmentos de 3956, 3364, 2270, 1856, 1772, 1314, 1230 e 445bp foram amplificados somente com os isolados provenientes da água, enquanto que fragmentos de 2660, 2201, 1268 e 646bp foram gerados apenas em isolados provenientes do solo.



**Figura 10. Perfis de BOX-PCR.** Canaletas: M, Marcador Molecular DNA  $\lambda$  clivado com *EcoRI* e *HindIII*; 1, Controle Positivo *P. alvei*; 2, Controle Positivo *P. polymyxa*; 3-6, isolados provenientes de solo: 3- *P. azotofixans*, 4-5 *P. alginolyticus*, 6- *P. pabuli*; 7-10 isolados provenientes de água: 7- *P. borealis*, 8-10 *P. validus*; 11, Controle Negativo da reação.

Dentro das espécies que tiveram um maior número de isolados, tais como *P. alginolyticus*, *P. pabuli* e *P. validus* no solo e *P. validus* e *P. azotofixans* na água, foram encontrados fragmentos em comum para estas espécies nos diferentes ambientes analisados e estes são apresentados nas tabelas 5 e 6.

**Tabela 5.** Isolados de *Paenibacillus* provenientes do solo que amplificaram determinados fragmentos no BOX-PCR

	<i>P. alginolyticus</i>	<i>P. pabuli</i>	<i>P. validus</i>
	n= 7	n= 5	n= 4
1645	6	3	3
1573	1	4	0
1457	1	3	4
1359	6	4	2
1259	7	1	3
1122	3	3	4
1087	5	4	0
954	2	3	4
841	1	1	4

**Tabela 6.** Isolados de *Paenibacillus* provenientes da água que amplificaram determinados fragmentos no BOX-PCR

	<i>P. validus</i>	<i>P. azotofixans</i>
	n= 8	n= 6
1856	5	4
1230	5	4
1122	0	4
954	6	1
841	4	6
715	7	2
618	7	2

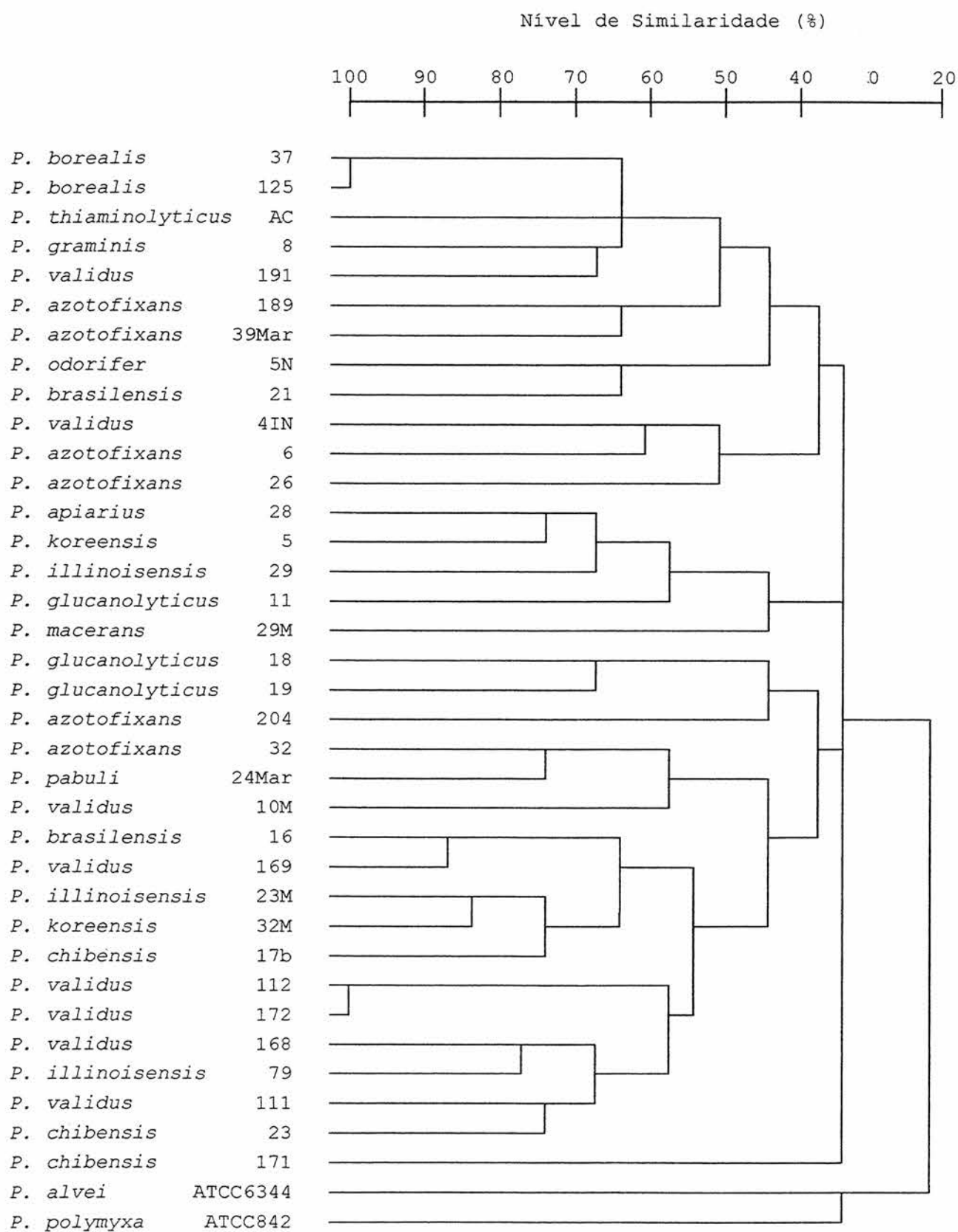
#### 4.4 Análises dos dendrogramas de BOX-PCR

##### 4.4.1 Análise do dendrograma dos isolados provenientes da água

De acordo com o dendrograma obtido através da análise dos isolados da água (Figura 11), foram observados cinco grandes grupos com um nível de similaridade de 35%. Um destes grupos pertence aos isolados controles, *P. alvei* e *P. polymyxa*. Os isolados de água com maior nível de

similaridade foram *P. borealis* (isolados 37 e 125) e *P. validus* (isolados 112 e 172) com similaridade de 100%. Em 73% de similaridade foram encontrados 9 grupos. Alguns isolados de *P. validus* agruparam-se com níveis de similaridade diferentes e o isolado 111 tendeu a agrupar-se com *P. chibensis* (isolado 23) a 73%. Em um grupo diferenciado encontra-se apenas um isolado de *P. chibensis* (isolado 171) apresentando o menor nível de similaridade (35%), ou seja, maior diversidade em relação aos demais. Alguns *P. azotofixans*, isolados 189-39Mar e 6-26, agruparam-se com similaridades diferentes, 64% e 51% respectivamente. Os isolados de *P. glucanolyticus* (isolados 18 e 19) agruparam-se em uma similaridade de 68%. No dendrograma também podemos observar 13 grupos únicos, tais como, *P. azotofixans* (isolado 26) juntando-se ao grupamento em 51%, *P. macerans* (isolado 29M) a 45% e *P. chibensis* (isolado 171) já citado anteriormente.

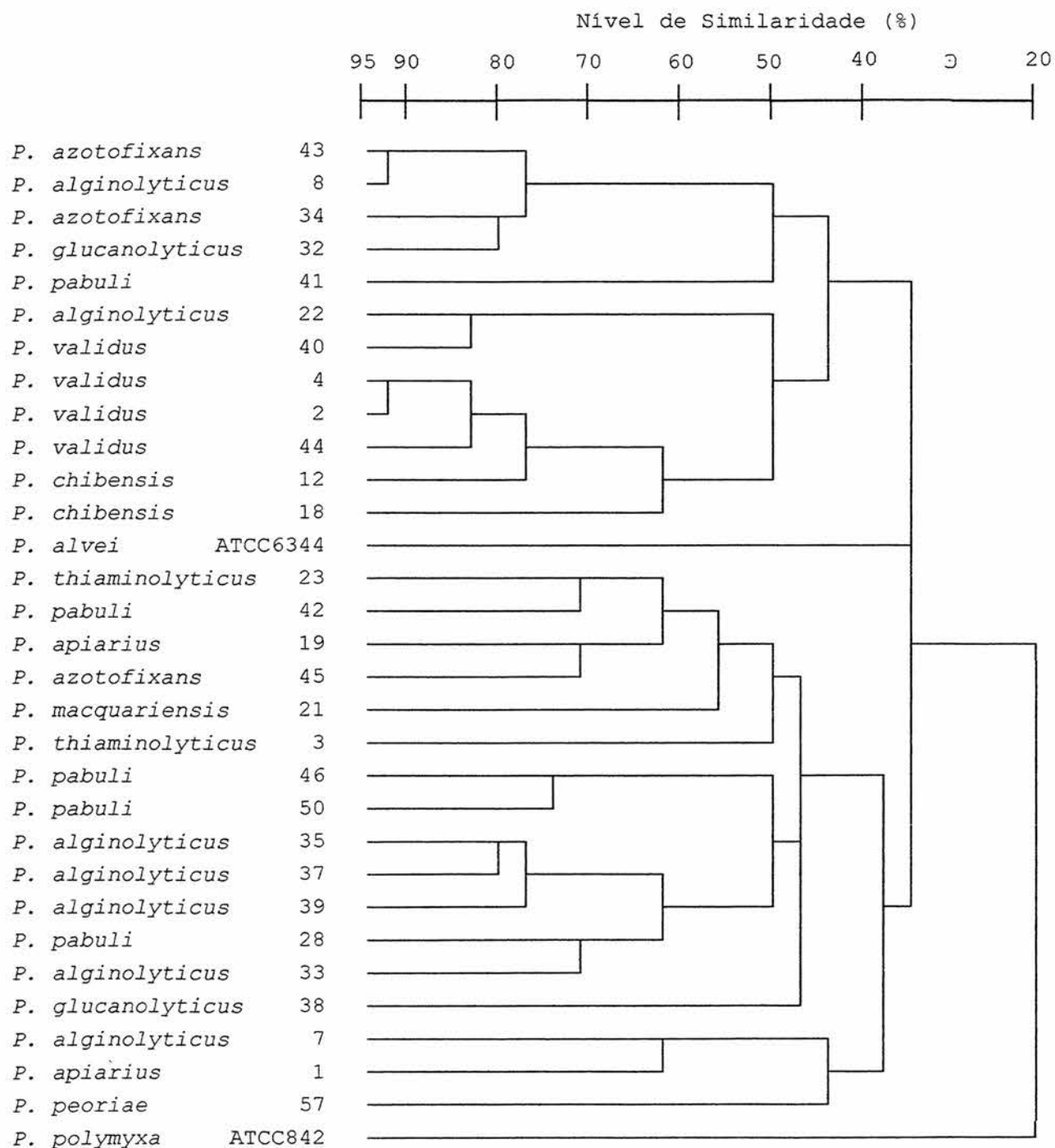




**Figura 11. Dendrograma baseado em análises de BOX-PCR dos isolados provenientes da água.**

#### 4.4.2 Análise do dendrograma dos isolados provenientes do solo

No dendrograma da análise de agrupamento dos isolados do solo apresentado na figura 12, foram observados quatro grandes grupos polimórficos em um nível de similaridade de 36%. Os controles, *P. alvei* e *P. polymyxa*, estão em grupos separados sendo que *P. alvei* está próximo aos isolados do solo. Os isolados mais próximos foram *P. azotofixans* (isolado 43solo) com *P. alginolyticus* (isolado 8solo) e *P. validus* (isolados 4 e 2solo) a 92%. Em um nível de similaridade de 70% observaram-se 8 grupos. Os isolados de *P. validus* (2, 4 e 44solo) mostraram-se semelhantes entre si agrupando-se a 92% e 83%, somente um dos isolados (40solo) agrupou-se com *P. alginolyticus* (22solo) a 83%. No grupo de *P. validus* observaram-se dois isolados de *P. chibensis* (isolados 12 e 18solo) em um nível de similaridade de 75 e 61%, respectivamente. Dois isolados de *P. pabuli* (6 e 50solo) agruparam-se com similaridade de 73%. Isolados de *P. alginolyticus* (39, 37 e 35solo) agruparam-se em um nível de similaridade de 75%. Os agrupamentos únicos observados foram oito, entre estes *P. pabuli* (41solo) em uma similaridade de 50%, *P. glucanolyticus* (isolado 38solo) a 48% e *P. periae* (isolado 57solo) a 44%.



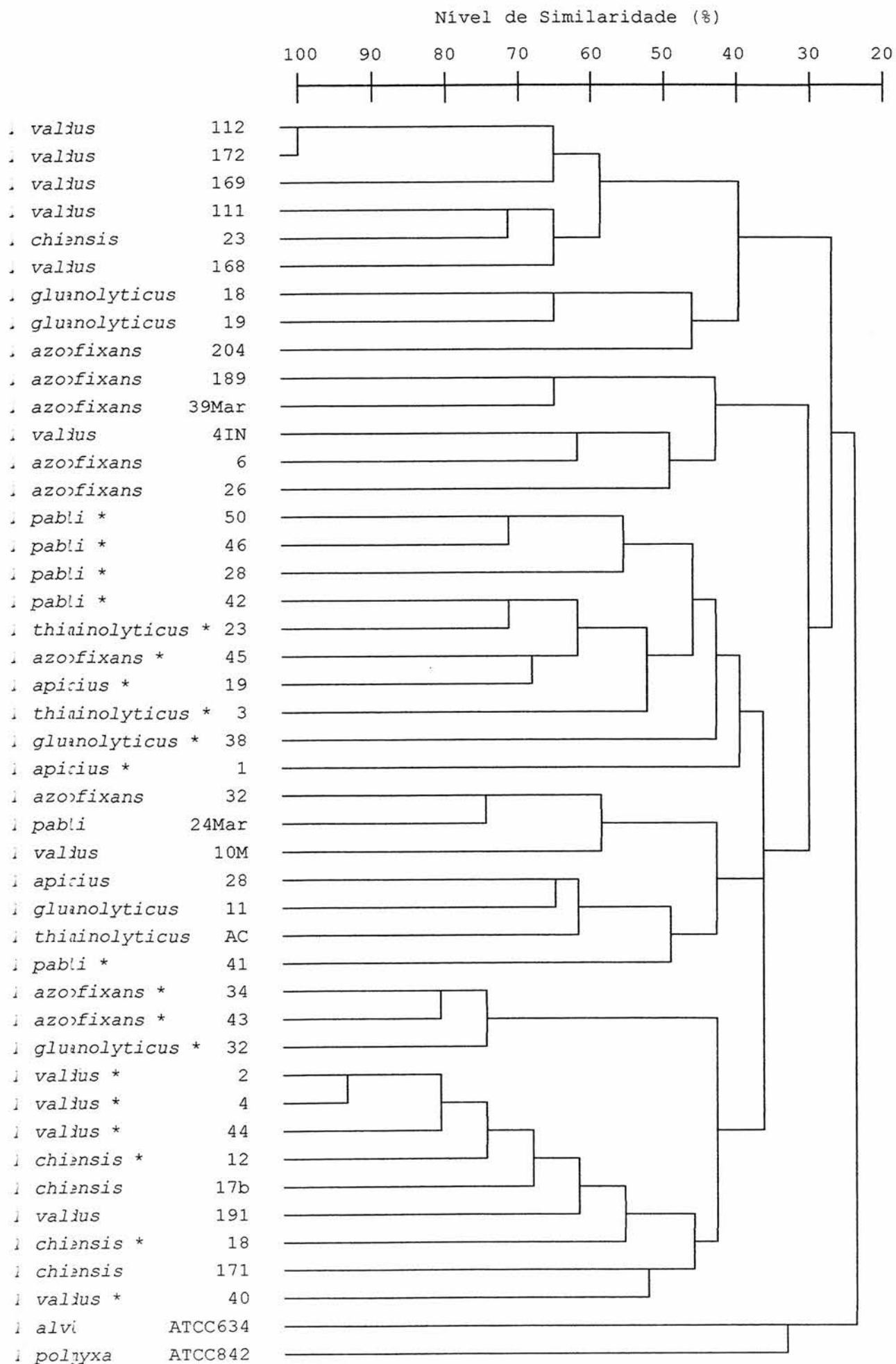
**Figura 12. Dendrograma baseado em análises de BOX-PCR do isolados provenientes do solo.**

#### 4.4.3 Análise do dendrograma dos isolados provenientes da água e do solo

Para esta análise foram consideradas somente as espécies identificadas em ambos os ambientes.

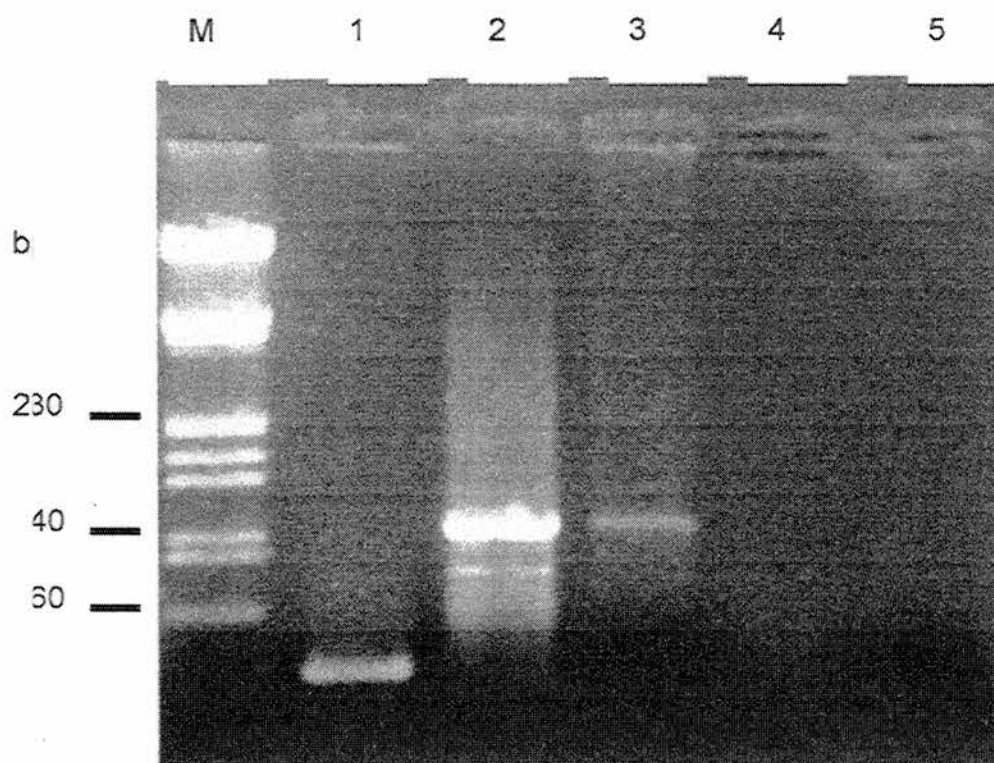
No dendrograma apresentado na figura 13, foram encontrados sete grandes grupos em um nível de similaridade de 40%. Como visto anteriormente na figura 11, as linhagens controle continuaram agrupadas e distanciadas dos outros isolados. Dois destes grandes grupos foram formados somente por isolados provenientes da água e um único grupo foi formado apenas com isolados provenientes do solo. Em um nível de similaridade de 70% foram encontrados 10 grupamentos. Os mesmos isolados de *P. validus* (isolados 112 e 172) que agruparam-se no dendrograma das amostras de água (Figura 11) continuaram agrupados no nível de similaridade de 100%. *P. chibensis* (isolado 23) voltou a agrupar-se com *P. validus* (isolado 111) com uma similaridade de 71%. O mesmo ocorreu com *P. validus* isolado do solo (isolados 2, 4 e 44solo), e o nível de similaridade continuou o mesmo do dendrograma das amostras de solo, 92% e 83%. *P. validus* (isolado 44solo) e *P. chibensis* (12solo), isolados do solo, também agruparam-se em uma similaridade de 75%. Isolados de *P. validus* (191) e *P. chibensis* (17b e 171) que não se agruparam no dendrograma das amostras de água (Figura 11) agruparam-se entre os *P. validus* e *P. chibensis* isolados do solo em níveis de similaridade diversos. *P. glucanolyticus* (18 e 19) isolados da água agruparam-se com uma similaridade de 67%. O mesmo ocorreu com *P. azotofixans* (isolados 189 e 39Mar) a 67%. Um *P. pabuli* (28solo) isolado do solo que

agrupou-se com outras espécies no dendrograma das amostras de solo (Figura 12), nesse dendrograma foi agrupado juntamente com os de mesma espécie em uma similaridade de 67%. O mesmo ocorreu com *P. azotofixans* (isolados 34 e 43solo) que agrupou-se com uma similaridade de 81%. Os grupos únicos formados foram dezessete, entre estes *P. azotofixans* (isolados 204 e 26) em um nível de similaridade de 46% e 50% respectivamente, *P. thiaminolyticus* (isolado 3solo) a 52%, *P. glucanolyticus* (isolado 38solo) a 43%, *P. apiarius* (isolado 1solo) a 40% e *P. pabuli* (isolado 41solo) em uma similaridade de 50%.



#### 4.5 Amplificação do gene *nifH*

Todos os isolados, tanto os provenientes da água como os do solo, foram submetidos a amplificação por PCR para a obtenção do fragmento do gene *nifH*. Somente os isolados previamente identificados como fixadores de nitrogênio produziram um único fragmento amplificado de aproximadamente 360bp, enquanto o controle positivo (*Rhizobium leguminosarum* *bv.* *trifolii*) amplificou um fragmento de 360bp (Figura 14). Os outros controles positivos utilizados, *Bradyrhizobium* *sp.* e *Paenibacillus polymyxa* não apresentaram nenhum amplificado.



**Figura 14. Amplificação do gene *nifH*.** Canaletas: M, Marcador Molecular DNA  $\lambda$  clivado com *EcoRI* e *HindIII*; 1, Controle Positivo DNA de *Rhizobium leguminosarum* *bv.* *trifolii* na concentração de 50ng/ $\mu$ l; 2, amostra de solo com concentração de 100ng/ $\mu$ l de DNA molde; 3, amostra de solo com concentração de 50ng/ $\mu$ l de DNA molde; 4, Controle Negativo da reação; 5, Controle Negativo *Paenibacillus alvei*.

Os isolados não fixadores de nitrogênio também foram submetidos ao PCR. Estes amplificaram somente bandas inespecíficas de alto tamanho molecular não apresentando o fragmento de 360bp e de 940bp.

Também foram testadas as concentrações de 100 e 50ng/ $\mu$ l de DNA molde por reação. A concentração que se mostrou mais eficiente foi a de 50ng/ $\mu$ l, enquanto que a de 100ng/ $\mu$ l produziu várias bandas de intensidade fraca, resultado de ampliações inespecíficas (Figura 14).



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação do gênero *Paenibacillus*

*Paenibacillus* não é diferenciado de outros gêneros por características fenotípicas. Através da utilização de ensaios bioquímicos, esse gênero é classificado como sendo *Bacillus*. Um oligonucleotídeo iniciador altamente específico denominado PAEN515F foi desenhado baseado numa seqüência de DNA conservada e encontrada no gene 16S rRNA das espécies de *Paenibacillus*. Shida et al. (1997a) relataram que o gênero *Paenibacillus* foi diferenciado com sucesso de outros *Bacillus* usando PAEN515F. Ash et al. (1991) utilizaram a técnica de hibridização para a identificação desse gênero. Shida et al. (1996) afirmaram que somente o uso de características fenotípicas para a diferenciação e identificação de Bacillaceae são inadequadas e o uso de sondas e oligonucleotídeos iniciadores de detecção específica deveriam ser amplamente usados para a diferenciação destes. No presente estudo, esse oligonucleotídeo iniciador foi utilizado para a identificação do gênero *Paenibacillus* entre várias bactérias em forma de bastonete e produtoras de esporos.

Estudos anteriores têm mostrado que amplificações pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de fragmentos do gene 16S rRNA usando oligonucleotídeos iniciadores específicos é muito útil para a identificação de

bactérias. Forsman et al. (1994) relataram que este procedimento é rápido e específico para identificar membros de *Francisella* em nível de gênero, espécie e subespécie. Shida et al. (1996) utilizaram com sucesso oligonucleotídeos iniciadores para identificar o gênero *Aneurinibacillus* e *Brevibacillus* e estes foram altamente específicos. Jagoueix et al (1994) utilizaram um fragmento do gene 16S rRNA para a descoberta de uma bactéria Gram negativa (denominada previamente de “liberobacter”) até então desconhecida que causava doenças em árvores produtoras de frutos cítricos. Avgustin et al. (1994) identificaram uma seqüência baseada no 16S rDNA que foi utilizada como oligonucleotídeo iniciador específico para distinguir o gênero *Prevotella* (*Bacteroides*) e suas linhagens. Rosado et al. (1996) desenvolveram um método molecular para a detecção de *P. azotofixans* que consistia na amplificação de um fragmento das regiões variáveis V1 a V4 do gene 16S rRNA seguida de uma hibridização com um oligonucleotídeo específico para esta região. Este sistema de detecção foi específico para *P. azotofixans* e não detectou outras espécies de *Paenibacillus* ou outros gêneros bacterianos.

Depois de identificado o gênero, houve a identificação das espécies. Através de testes bioquímicos estas foram comparadas e diferenciadas utilizando-se chaves e tabelas com características fenotípicas construídas especialmente para este trabalho e que não são encontradas na literatura disponível para *Paenibacillus*. Para a identificação das espécies a maioria dos autores utiliza o sistema API50CH (alguns exemplos: von der Weid et al., 2000, para a identificação de *P. polymyxa*, Seldin et al., 1998, para *P. azotofixans*,

Guemouri-Athmani et al., 2000, para *P. polymyxa* e Elo et al., 2001, para a identificação de *P. borealis*).

As espécies do gênero *Paenibacillus* não possuem tabelas ou chaves de identificação que compreendam todas as espécies já descritas, baseados em características fenotípicas assim como outros espécies e gêneros bacterianos possuem. Devido a esse problema, estas foram construídas especialmente para este trabalho utilizando-se a literatura disponível. Este estudo apresenta uma maneira simplificada de identificação fenotípica das espécies pertencentes ao gênero *Paenibacillus*. Um total de trinta e oito espécies e uma subespécie e cento e quatro testes bioquímicos foram incluídos para estas análises e para a construção de chaves e tabelas que fossem práticas para uma rápida identificação.

Entre as espécies identificadas nos ambientes de água e solo (Tabela 4) pode-se constatar uma maior diversidade de espécies na água. Essa maior diversidade pode ser devido ao fato de que essas amostras foram coletadas e isoladas de um maior número de ambientes (Lami, Ipanema e Belém Novo) com um ecossistema diversificado. Enquanto que as amostras provenientes do solo foram coletadas em monoculturas de milho, ambiente que não possui um ecossistema complexo.

Na água foi observada uma maior porcentagem de bactérias fixadoras de nitrogênio (37%) que no solo (14%). Este resultado não foi o esperado, já que existem muitas espécies fixadoras de nitrogênio no solo. Porém o ambiente da água é transitório e muito mais diversificado que o da

monocultura de milho, como citado anteriormente, e vários microrganismos são carregados do solo para a água através das chuvas.

## **5.2 Caracterização genética dos isolados de *Paenibacillus***

As espécies identificadas anteriormente foram todas submetidas a uma caracterização molecular através de elementos repetitivos encontrados dispersos no genoma. Uma classe única de elementos repetitivos e altamente conservados dentro do genoma de *S. pneumoniae* foram identificados e denominados de BOX. Embora nenhuma função clara tenha sido proposta para estes elementos, eles podem representar domínios regulatórios de genes relacionados à virulência ou a alguma competência específica (van Belkum et al., 1996).

Padrões de bandas geradas por rep-PCR (como é chamado coletivamente REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR) têm sido extensivamente estudadas nos últimos anos por diversos autores.

Neste estudo, foi usada a aparente variabilidade genética nas proximidades dos elementos BOX para a caracterização do genoma de diferentes espécies de *Paenibacillus*.

O protocolo de rep-PCR, assim como outras técnicas baseadas em PCR, está sujeito a variações experimentais, tais como: variações na concentração do oligonucleotídeo iniciador, do DNA molde, da composição do tampão de PCR e a presença de quantidades mínimas de DNA contaminante podem afetar e comprometer a reprodutibilidade da técnica. Para evitar esses

problemas, controles foram usados em testes preliminares para a otimização e a padronização do protocolo de BOX-PCR.

A concentração de  $Mg^{+2}$  teve um profundo efeito na complexidade dos padrões de bandas. As concentrações relativamente altas levaram a amplificação de um maior número de fragmentos, mas com aumento de rastros e perda da resolução. As concentrações mais baixas produziram um menor número de bandas. Uma concentração final de 3,5mM adicionada a reação de PCR forneceu uma boa resolução e bom número de fragmentos para posterior análise. Diferente da concentração de 6,7mM utilizada no protocolo de Louws et al. (1994) para a diferenciação de patovares e linhagens de *Xanthomonas* e *Pseudomonas* e também utilizada por von der Weid (2000) para a avaliação da diversidade de *P. polymyxa* durante os quatro estágios de crescimento do milho. Esta concentração foi considerada muito elevada para a realização do BOX-PCR no presente trabalho. As concentrações de cloreto de magnésio encontradas na literatura vão desde 1,5mM, utilizada por van Belkum et al. (1996) para a tipificação de linhagens de *Streptococcus pneumoniae*, 3mM utilizada por Allipi & Aguilar (1998) para diferenciar *P. larvae* subsp. *larvae* de diferentes origens geográficas, 4mM utilizada por Seldin et al. (1998) para a diferenciação de *P. azotofixans* isolados de diferentes partes do solo, até 7,5mM utilizada por Hurek et al. (1997) para a diferenciação de espécies de *Azoarcus*.

Quanto a concentração de DNA molde, a maioria dos protocolos utilizou cerca de 50 ng/ $\mu$ l como Seldin et al. (1998) para a diferenciação de *P. azotofixans*, sendo que o protocolo de Allipi & Aguilar (1998) utiliza 10ng/ $\mu$ l

para *P. larvae* subsp. *larvae*. Neste trabalho a concentração que produziu um bom perfil de fragmentos foi a de 100ng/ $\mu$ l, o que está de acordo com Jarvis et al. (2001) que também obtiveram um padrão de bandas ideal para a diferenciação de isolados de *Streptococcus bovis*, o mesmo foi usado por Versalovic et al. (1994) que desenvolveram o protocolo de rep-PCR e também conforme von der Weid et al. (2000) que utilizaram essa concentração para a diferenciação de *P. polymyxa*. Segundo Versalovic et al. (1998) concentrações insuficientes de DNA molde e preparações impuras produzem limitações nos padrões de bandas.

Utilizou-se BSA no preparo das amostras para as reações de amplificação na concentração de 8ng/ $\mu$ l (Wintzingerode et al., 1997) com o objetivo de melhorar as condições de anelamento do oligonucleotídeo iniciador com o DNA a ser amplificado, o que resultou no aparecimento de um número maior de bandas e/ou bandas mais intensas quando visualizadas no gel de agarose. No protocolo original utilizado por Versalovic et al. (1994), foi utilizada uma concentração de 0,68ng/ $\mu$ l. Nos experimentos realizados sem a adição de BSA não houve a produção de amplificadas em alguns isolados e em outros obteve-se um pequeno número de bandas.

Diferente de outras técnicas que utilizam o PCR, somente um oligonucleotídeo iniciador é necessário para o protocolo de BOX-PCR. Esse único oligonucleotídeo é suficiente para produzir padrões de bandas devido a distribuição das repetições em uma orientação invertida no genoma. De acordo com Zavaglia et al. (2000) a utilização de somente um oligonucleotídeo iniciador fornece padrões espécie-específicos, não há a necessidade de

conhecimento prévio do genoma e quando as condições de amplificação são definidas os resultados são reproduzíveis. A concentração do oligonucleotídeo iniciador descrita por Alippi & Aguilar (1998) como sendo de 2,5 $\mu$ M para a diferenciação de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* de várias origens geográficas, não produziu um perfil de bandas adequado para este trabalho. Devido a isso, a quantidade foi duplicada (5 $\mu$ M) com conseqüente aumento do número de bandas bem como a intensidade das mesmas. Na literatura, Kim et al. (2001) utilizaram uma concentração muito baixa (20pmol) para a diferenciação de espécies de *Bacillus*, von der Weid et al. (2000) também utilizou uma concentração baixa, 50pmol, para a caracterização de *P. polymyxa*. Seldin et al. (1998) usaram a concentração de 2 $\mu$ M em *P. azotofixans*. Jedryezka et al. (1999) utilizaram 1,30mM de oligonucleotídeo iniciador para a caracterização molecular de espécies de *Leptosphaeria* “altamente virulentas” e “fracamente virulentas”.

No trabalho de van Belkum et al. (1996), quando foram testados duas temperaturas de anelamento diferentes para o DNA de *Streptococcus pneumoniae*, 50°C e 60°C, a de 50°C favoreceu a amplificação de fragmentos maiores; todavia o poder de resolução não aumentou com a temperatura de 60°C embora o padrão de fragmentos parecesse mais claro. Neste trabalho, temperaturas de anelamento de 50 a 53°C foram avaliadas por seu efeito nos perfis. Nenhum ou poucos fragmentos foram produzidos quando a temperatura mais alta foi utilizada (53°C). Ao contrário a temperatura de 50°C forneceu padrões reprodutíveis com um número suficiente de amplificadas para posterior análise e não favoreceu a amplificação dos fragmentos de alto tamanho

molecular. Este resultado está de acordo com Gardener et al. (2000) que utilizaram a temperatura de 50°C para definir a diversidade de *Pseudomonas* produtoras de compostos antifúngicos. Alippi & Aguilar (1998) utilizaram a temperatura de 53°C para caracterizar *P. larvae* subsp. *larvae* de diferentes origens geográficas. A mesma temperatura foi utilizada por von der Weid et al. (2000) para a diferenciação de *P. polymyxa*. As temperaturas de anelamento consideradas muito baixas são também aplicadas para o BOX-PCR. No trabalho de Zavaglia et al. (2000), foi utilizada a temperatura de 40°C e esta diferenciou com sucesso isolados de *Bifidobacterium* sp. Mas, apesar disso, temperaturas muito baixas geram problemas por não deixar claro se o oligonucleotídeo iniciador anelou a seqüências repetitivas ou agiu como um oligonucleotídeo aleatório. De acordo com Versalovic et al. (1994), altas temperaturas de anelamento são desejáveis por aumentarem a reprodutibilidade dos padrões de bandas e por produzirem poucos produtos espúrios de amplificação.

A temperatura e o número de ciclos foram modificados de Alippi & Aguilar (1998). Neste trabalho, obteve-se um melhor resultado ajustando-se o tempo e a temperatura de anelamento e de desnaturação inicial e diminuindo-se o tempo de extensão. Com isso obteve-se uma maior exposição da fita molde de DNA ao oligonucleotídeo iniciador. Um maior tempo de desnaturação é necessário quando há a utilização direta de culturas de células para a realização do PCR. O tempo de extensão foi diminuído para a inibição de ampliações de fragmentos de alto tamanho molecular. Segundo Versalovic et al. (1998), os parâmetros de reação que facilitam o aparecimento de



amplificados de alto tamanho molecular são: excesso de dNTPs, excesso de oligonucleotídeos iniciadores, grande quantidade de DNA molde e tempos de extensão longos a cada ciclo de PCR.

A alteração das condições de tamponamento ou a marca da *Taq* DNA polimerase usada nas reações podem também levar a alteração da especificidade do BOX PCR (mais amplicons sintetizados ou diminuição na resolução dos fragmentos) segundo van Belkum et al. (1996).

De acordo com Versalovic et al. (1994), a quantidade ideal de fragmentos de BOX-PCR para a análise seria de 8-15. Neste trabalho a quantidade de fragmentos encontrada foi de 5-16 e esta variou entre as diferentes literaturas consultadas. Louws et al. (1994) produziram de 5-20 fragmentos para a diferenciação de patovares e linhagens de *Xanthomonas* e *Pseudomonas*, Dombek et al. (2000) encontraram de 25-40 amplificados que separaram *E. coli* de origem humana dos isolados de outros animais, Kim et al. (2001) diferenciaram *Bacillus anthracis* de outras espécies de *Bacillus* a partir da produção de 4-17 fragmentos de BOX-PCR e Gardener et al. (2000) estudaram a diversidade de *Pseudomonas* produtoras de compostos antifúngicos com 10-30 amplificados. Seldin et al. (1998) relataram que o BOX-PCR de *P. azotofixans* isolados de solo de Várzea produziu um número excessivo de fragmentos que não puderam ser analisados no estudo.

No presente trabalho, não foram considerados para análise e construção dos dendrogramas fragmentos amplificados com mais de 5kb. Snelling et al. (1996) consideraram que os fragmentos de alto tamanho molecular são artefatos de PCR e estão próximos do limite de extensão da *Taq*

polimerase. Os amplificadores maiores que 5kb não são sempre reproduzíveis e portanto não devem ser incluídos nas comparações de perfis. Louws et al. (1994) constataram que fragmentos grandes (5 a 6kb) e fragmentos fracos não são sempre amplificados na mesma medida ou não são sempre visíveis depois de corados com brometo de etídeo.

O BOX-PCR gera padrões robustos e produz perfis de fragmentos altamente complexos para a análise a olho nu. Devido a isso, foi utilizado o programa KODAK 1D v.3.5.2 para o cálculo do tamanho molecular das bandas através do padrão de DNA  $\lambda$  clivado com *EcoRI* e *HindIII*. Segundo Snelling et al. (1996), uma vantagem do rep-PCR é que os perfis são compostos de fragmentos entre 100bp a 4kb e podem ser resolvidos em um gel de agarose, enquanto alguns outros métodos de PCR exigem géis de poliacrilamida para a resolução de amplificadores muito pequenos. No presente estudo, foram encontrados fragmentos amplificados de 4365 a 445bp.

Dentro das espécies que tiveram um maior número de isolados identificados foram encontrados fragmentos em comum. *P. alginolyticus* teve um único fragmento de 1259bp em 100% dos isolados, enquanto que nos isolados de *P. validus* isolados do solo quatro fragmentos: 1457, 1122, 954 e 841bp puderam ser observados em todos eles. *P. azotofixans* isolado da água, amplificou em 100% dos isolados o fragmento de 841bp. As outras espécies também apresentaram os amplificadores mencionados anteriormente, mas não em um grande número de isolados. Não há como saber se estas bandas encontradas em todos os isolados da mesma espécie tem a mesma seqüência, mas estes amplificadores podem ser úteis na caracterização de uma determinada

espécie devido ao fato de eles aparecerem em todos os isolados. von der Weid et al. (2000) constataram que havia uma grande diversidade em amostras de *Paenibacillus polymyxa* e que um fragmento de 800bp era comum e aparecia em 99% dos isolados. Alippi & Aguilar (1998) constataram a presença de poucas bandas únicas entre os isolados de *P. larvae* subsp. *larvae* de diferentes origens geográficas. Já Zavaglia et al. (2000) relataram que havia amplificados em comum nas espécies *Bifidobacterium breve* (680bp), *Bifidobacterium bifidum* (520 e 1700bp), *Bifidobacterium longum* (570bp) e *Bifidobacterium adolescentis* (1000 e 300bp). Sendo que um fragmento de 340bp só estava presente em *Bifidobacterium infantis*. Silva et al. (1999) obtiveram duas bandas de 1000 e 800bp em 90% dos isolados de *Bacillus sphaericus*, produtores de toxinas contra mosquitos.

A informação dada pelo rep-PCR nos permitiu distinguir 9 grupamentos nos isolados da água em um nível de similaridade de 73% e no solo 8 grupos em uma similaridade de 70%. Overweg et al. (1999) encontraram 8 grupos em um total de 37 isolados de *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina que eram suspeitos de serem clones. O mesmo ocorreu com Jeong & Myrold (2001) que diferenciaram 8 grupamentos de *Frankia* sp. em uma similaridade de 65%. Seldin et al. (1998) relataram que em 46 linhagens de *P. azotofixans* foram encontrados 4 grupamentos. Em um outro estudo von der Weid et al. (2000) encontraram uma grande diversidade em *P. polymyxa*, sendo que 65 isolados produziram 18 grupamentos em uma similaridade de 95%. Vinuesa et al. (1998) constataram uma grande diversidade em isolados

de *Bradyrhizobium japonicum*, onde foram encontrados 14 grupamentos entre 15 isolados em um nível de similaridade de 65%.

Neste estudo, isolados de mesma espécie e de espécies diferentes foram agrupados em níveis de similaridade distintos. Dentre os isolados da água *P. validus*, *P. chibensis*, *P. illinoisensis*, *P. apiarius*, *P. koreensis*, *P. azotofixans* e *P. brasilensis* agruparam-se intra e interespecificamente. Entre os isolados de solo estão alguns isolados de *P. alginolyticus*, *P. pabuli*, *P. azotofixans*, *P. apiarius*, *P. glucanolyticus* que agruparam com similaridades baixas ou com outras espécies. Todavia, há uma grande diversidade inter e intraespecífica nos isolados de *Paenibacillus*. Segundo Vinuesa et al. (1998), o rep-PCR permite uma maior diferenciação de grupamentos em nível de espécie e linhagem. Esta técnica determinou a relação filogenética de linhagens de *Bradyrhizobium japonicum* que eram idênticos pela sorotipagem. Jeong & Myrold (2001) relataram que o rep-PCR diferenciou em 16 grupos apenas um padrão de 16S rRNA de *Frankia* identificado por RFLP. Segundo Louws et al. (1994) bactérias altamente relacionadas, como visto por outros protocolos experimentais como hibridização de DNA, podem ter perfis divergentes e que bactérias associadas com o mesmo hospedeiro ou doença podem ser facilmente diferenciadas devido a complexidade dos produtos amplificados gerados por rep-PCR.

No presente trabalho, *P. azotofixans* (isolado 43solo) e *P. alginolyticus* (isolado 8solo) isolados do solo foram agrupados com um alto nível de similaridade (92%), *P. alginolyticus* (isolado 22solo) e *P. validus* (isolado 40solo) agruparam-se a 83%. Nas análises de Shida et al. (1997a) o

agrupamento *P. alginolyticus* com *P. validus* está em concordância com a filogenia baseada no 16S rRNA. Nos isolados de água, *P. brasiliensis* (isolado 16) e *P. validus* (isolado 169) agruparam-se a 85%, e *P. illinoisensis* (isolado 23M) com *P. koreensis* (isolado 32M) a 84%. Na literatura, através do BOX-PCR, outras bactérias de espécies diferentes também não puderam ser discriminadas e foram agrupadas. Nos estudos de Kim et al. (2001), *B. cereus* e *B. thuringiensis* tiveram um nível de similaridade de 98%, assim como *B. pumilus* e *B. subtilis* (96%) e *B. licheniformis* agrupou-se com *B. megaterium* a 60%. Zavaglia et al. (2000) relataram que *Bifidobacterium dentium* e *Bifidobacterium animalis* agruparam-se em uma similaridade de 82%.

As espécies, neste estudo, mais semelhantes entre si e que tenderam agrupar-se foram os isolados de *P. validus*, tanto da água quanto do solo, e os de *P. alginolyticus* no solo. Como estas duas espécies possuíam um maior número de isolados, foi possível uma análise mais completa o que resultou nesses grupamentos de mesma espécie. *P. chibensis* em ambos os ambientes tenderam a agrupar-se a *P. validus*. Analisando a chave de identificação e as tabelas de testes bioquímicos foi possível constatar que fenotipicamente estas espécies estão próximas, de 43 testes bioquímicos, eles diferem em apenas 10.

O agrupamento de isolados de mesma espécie foi mais visualizado no dendograma da água e do solo juntos (Figura 13), onde isolados que não se agruparam nos dendogramas anteriores juntaram-se neste. Como exemplos disso estão *P. azotofixans* (43solo e 34solo), *P. pabuli* (28solo) e alguns isolados de *P. validus* (isolado 191 e 169), e *P. chibensis* (isolados 17b, 171 e

12 solo) que estavam separados nos dendogramas das figuras 11 e 12. O *P. pabuli* (isolado 28solo) que estava agrupado com *P. alginolyticus* (isolado 33solo) no dendograma do solo (Figura 12) se agrupou com os de mesma espécie no dendograma da água e solo (figura 13). Esses agrupamentos foram facilitados pelo fato de que nesta análise foram consideradas somente as espécies identificadas em ambos os ambientes.

Quando os isolados de água e solo foram considerados, observaram-se sete grandes grupamentos em um nível de similaridade de 42% (Figura 13). Estes grupamentos foram bem distintos, separando, na sua maioria, os isolados da água dos isolados do solo, sugerindo que populações distintas estejam estabelecendo-se nestes ambientes. Dombek et al. (2000) usando o BOX-PCR também diferenciou com sucesso isolados de *E. coli* provenientes de seres humanos, gado, porcos, ovelhas, galinhas, patos e gansos, colocando-os desse modo dentro dos corretos grupos de origem. Já Smith et al. (1995) agruparam isolados de *Burkholderia solanacearum* provenientes da América do Sul (exceto do Brasil) separando-os de isolados de várias partes do mundo, sendo os da América do Sul os que possuíam maior diversidade genética. Seldin et al. (1998) encontraram diferenças significativas entre as amostras de *P. azotofixans* isolados de diferentes partes do solo (rizoplano, rizosfera e de solo não pertencente a rizosfera), sugerindo que as plantas selecionam uma determinada subpopulação de bactérias. Neste mesmo estudo também foram encontradas diferenças significativas entre os isolados de *P. azotofixans* durante os quatro estágios do crescimento do milho (10, 30, 60 e 90 dias). Alippi & Aguilar (1998) tentaram encontrar a origem de

*P. larvae* subsp. *larvae*, causador de doenças em abelhas na Argentina, através do BOX-PCR. Os isolados da Argentina apresentaram os perfis A, B e C, enquanto que *P. larvae* subsp. *larvae* de outros países apresentaram somente os perfis A e B. As linhagens dos Estados Unidos e Alemanha foram autênticas e relacionadas ao perfil A, enquanto que os isolados da República Tcheca e da Inglaterra pertenciam ao perfil B. Linhagens da França, Polônia, Itália, Suécia e Nova Zelândia apresentaram os dois perfis (A e B). Estes resultados sugeriram que *P. larvae* subsp. *larvae* na Argentina pode ser proveniente de múltiplas fontes. Guemouri-Athmani et al. (2000), utilizando RFLP-PCR, conseguiram avaliar a estrutura genética de *P. polymyxa* de acordo com a sua origem (solos cultivados com trigo a 5, 26, 70 e 2000 anos), e esta estrutura tem sido afetada pelo longo tempo de cultivo do solo, quanto mais longo o cultivo maior a predominância de um genótipo.

Os controles utilizados neste estudo, *P. alvei* e *P. polymyxa* permaneceram bem separados dos demais isolados de *Paenibacillus*. Este fato também foi observado por Jeong & Myrold (2001) onde os padrões de bandas de duas linhagens controles de *Frankia* foram completamente diferentes dos padrões apresentados por outras amostras.

Através dos procedimentos utilizados no presente estudo, o BOX-PCR foi altamente discriminatório, pois revelou um grande número de agrupamentos distintos. Os resultados apresentados aqui claramente demonstram que a sequência BOX está presente no genoma de *Paenibacillus*, tanto em isolados de água como de solo. Estes resultados também demonstram que o BOX-PCR é uma ferramenta útil para a análise genética de

actéris e para a taxonomia bacteriana, devido ao fato de permitir a produção e perfis de bandas de gêneros, espécies, linhagens, patovares e sroovares e, com isso, auxiliar na determinação de relações filogenéticas, como foi visto por diversos autores citados anteriormente.

### 5.3 Confirmação das espécies fixadoras de nitrogênio

Os oligonucleotídeos iniciadores degenerados selecionados por Zehr e McFaynolds (1989) são amplamente usados para amplificação de um segmento de 359bp do gene *nifH* de vários microrganismos, sendo uma técnica muito utilizada para a análise destes no ambiente.

No presente trabalho, um fragmento de aproximadamente 360bp foi amplificado do controle positivo *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. O mesmo não ocorreu com os outros controles positivos utilizados, *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus polymyxa*, que não apresentaram nenhum amplificado. Achouak et al. (1999) relataram um amplificado muito fraco de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio.

Diferente do fragmento esperado de 359bp, os isolados identificados como fixadores de nitrogênio produziram um amplificado de aproximadamente 40bp. Estes fragmentos poderiam ser artefatos de PCR, mas essa hipótese foi descartada já que nos controles negativos utilizados essa banda não foi obtida. Usando esses mesmos oligonucleotídeos degenerados, Zani et al. (2000) também encontraram uma variação no tamanho e amplificaram um segmento de 460bp em amostras do Lago George em Nova York, sendo que as seqüências obtidas não foram similares a nenhuma de estudos anteriores.



Ohkuma et al. (1999) encontraram um amplificado de 470bp na comunidade microbiana simbiótica do intestino de cupins. Rosado et al. (1998) utilizaram oligonucleotídeos degenerados juntamente com específicos para a obtenção de um fragmento de 360bp em *P. azotofixans*.

Outra hipótese para a ocorrência do amplificado de 940bp seria a presença de múltiplas cópias do gene *nifH* no genoma. Os oligonucleotídeos poderiam estar anelando em cópias diferentes e isto produziria um fragmento de tamanho maior que o esperado. Segundo Rosado et al. (1998), a ocorrência de múltiplas cópias de genes *nifH* e/ou sistemas alternativos de nitrogenase têm sido encontradas para várias espécies bacterianas. Neste mesmo estudo, os autores encontraram múltiplas regiões homólogas ao *nifH* com divergência nas seqüências em *P. azotofixans*. Zehr et al. (1995) relataram que *Clostridium pasteurianum* possui seis cópias do gene *nifH*, sendo uma cópia de nitrogenase alternativa (sistema de nitrogenase que contém vanádio) e *Azotobacter* também possui várias cópias. Kirshtein et al. (1991) constataram a presença de múltiplas cópias do gene *nifH* em *Anabaena oscillarioides*.

Kessler et al. (1998) usando sondas específicas para cada gene *nif* detectaram múltiplos RNAs mensageiros em *Methanococcus maripaludis*, sendo que o *nifH* produziu dois transcritos, um de 930bp e outro de 1,7kb. Este transcrito de 930bp está de acordo com o tamanho do amplificado encontrado neste trabalho de aproximadamente 940bp.

No presente trabalho alguns isolados não fixadores de nitrogênio amplificaram bandas de alto tamanho molecular. Affourtit et al. (2001) relataram

o aparecimento de bandas inespecíficas em controles negativos no estudo com microrganismos do estuário do rio Neuse na Carolina do Norte.

Segundo Achouak et al. (1999) a obtenção de um amplificado com oligonucleotídeos *nif* não é o bastante para inferir a presença do gene *nif* e a confirmação por hibridização ou sequenciamento é assim necessária.

Ben-Porath & Zehr (1994), usando esse conjunto de oligonucleotídeos, confirmaram que a seqüência do produto de 359bp é suficientemente variável para distinguir seqüências do gene *nifH* de cianobactérias, de arqueobactérias e eubactérias, bem como de genes *nifH* de heterocistos dos de não heterocistos. Rosado et al. (1998) usando oligonucleotídeos degenerados demonstraram que há variação suficiente em nível de DNA para distinguir partes da seqüência do gene *nifH* de *P. azotofixans* dos genes de espécies relacionadas (*P. polymyxa* e *P. macerans*).

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHOUAK, W.; NORMAND, P.; HEULIN, T. Comparative phylogeny of *rrs* and *nifH* genes in the Bacillaceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.49, p.961-967, 1999.

AFFOURTIT, J.; ZEHR, J. P.; PAERL, H. W. Distribution of nitrogen-fixing microorganisms along the Neuse river estuary, North Carolina. **Microbial Ecology**, New York, v.41, n.2, p.114-123, 2001.

AGUILERA, M.; MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M.; SUÁREZ, A.; GUERRA, V.; LIZAMA, C.; BENNASAR, A.; RAMOS-CORMENZANA, A. *Paenibacillus jamilae* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium able to grow in olive-mill wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v.51, p. 1687-1692, 2001.

ALEXANDER, B.; PRIEST, F. G. *Bacillus glucanolyticus*, a new species that degrades a variety of  $\beta$ -glucans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.39,n.2, p.112-115, 1989.

ALIPPI, A. M.; AGUILAR, O. M. Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* susp. *larvae* from diverse geographical origin by the polymerase chain reaction and BOX primers. **Journal of Invertebrate Pathology**, Amsterdam, v.72, p.21-27, 1998.

ASH, C.; FARROW, J. A. E.; WALLBANKS, S.; COLLINS, M. D. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. **Letters in Applied Microbiology**, New York, v.13, p. 202-206, 1991.

- ASH, C.; PRIEST, F. G.; COLLINS, M. D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.64, p.253-260, 1993.
- AVGUSTIN, G.; WRIGHT, F.; FLINT, H. J. Genetic diversity and phylogenetic relationships among strains of *Prevotella (Bacteroides) ruminicola* from the rumen. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.44, 246-255, 1994.
- BEN-PORATH, J.; ZEHR, J. P. Detection and characterization of cyanobacterial *nifH* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.3, p. 880-887, 1998.
- BERGE, O.; GUINEBRETIERE, M.; ACHOUAK, W.; NORMAND P.; HEULIN, T. *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v.52, p. 607-616, 2002.
- BOSSHARD, P. P.; ZBINDEN, R.; ALTWEGG, M. *Paenibacillus turicensis* sp. nov., a novel bacterium harboring heterogeneities between 16S rRNA genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v.52, p.2241-2249, 2002.
- CHANWAY, C. P. Differential response of western hemlock from low and high elevations to inoculation with plant growth-promoting *Bacillus polymyxa*. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v.27, n.6, p.767-775, 1995.
- CHRISTNER, B. C.; MOSLEY-THOMPSON, E.; THOMPSON, L. G.; ZAGORODNOV, V.; SANDMAN, K.; REEVE, J. N. Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice. **Icarus**, Amsterdam, v.144, p.479-485, 2000.
- CHRISTNER, B. C.; MOSLEY-THOMPSON, E.; THOMPSON, L. G.; REEVE, J. N. Isolation of bacteria and 16S rDNAs from Lake Vostok accretion ice. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.3, n.9, p.570-577, 2001.
- CHUNG, Y. R.; KIM, C. H.; HWANG, I.; CHUN, J. *Paenibacillus koreensis* sp. nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v.50, p. 1495-1500, 2000.

CLAUS, D.; BERKELEY, R.C.W. Genus *Bacillus*. In: SNEATH, P.H.A (ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: The Willians and Willians, 1986. V.2, p. 1105-1140.

DAANE, L. L.; HARJONO, I.; BARNS, S. M.; LAUNEN, L. A.; PALLERONI, N. J.; HÄGGBLUM, M. M. PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salta marsh plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v.52, p.131-139, 2002.

DASMAN; KAJIYAMA, S.; KAWASAKI, H.; YAGI, M.; SEKI, T.; FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI, A. *Paenibacillus glycanilyticus* sp. nov., proposal for a new species that degrades heteropolysaccharide produced by the cyanobacterium *Nostoc commune*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v.52, p. 1669-1674, 2002.

DIAS, L. A. S. Análises Multidimensionais. In: ALFENAS, A. C. (ed.) **Eletroforese de Isoenzimas e Proteínas Afins: Fundamentos e Aplicações em Plantas e Microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p.405-473.

DJORDJEVIC, S. P.; FORBES, W. A.; SMITH, L. A.; HORNITZKY, M. A. Genetic and biochemical diversity among isolates of *Paenibacillus alvei* cultured from australian honeybee (*Apis mellifera*) colonies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.3, p.1098-1106, 2000.

DOMBEK, P. E.; JOHNSON, L.; ZIMMERLEY, S. T.; SADOWSKY, M. J. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.6, p.2572-2577, 2000.

ELO, S.; SUOMINEN, I.; KÄMPFER, P.; JUHANOJA, J.; SALKINOJA-SALONEN, M.; HAAHTELA, K. *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v.51, p. 535-545, 2001.

FORSMAN, M.; SANDSTROM, G.; SJOSTEDT, A. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.44, p.38-46, 1994.

GARDINER, B. M. M.; SCHROEDER, K. L.; KALLOGER, S. E.; LAAIJMAKERS, J. M.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M. Genotypic and phenotypic diversity of *phlD*-containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 66, n5, p. 1939-1946, 2000.

MEURATHMANI, S.; BERGE, O.; BOURRAIN, M.; MAVNGUI, P.; HIÉR, J. M.; BHATNAGAR, T.; HEULIN, T. Diversity of *Paenibacillus olymya* populations in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian soils. **European Journal of Soil Biology**, Amsterdam, v.36, p.149-59, 2000.

EYNRICKX, M.; VANDEMEULEBROECKE, K.; SCHELDEMAN, P.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; DE VOS, P.; LOGAN, N. A.; AZIZ, A. M.; ALI, N.; BERKELEY, R. C. W. *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *gordonae* (Fichinoty et al. 198) Ash et al. 1994 Is a Later Subjective Synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *validus* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994 Emended description of *P. validus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.45, n.4, p. 661-669, 1995.

EYNRICKX, M.; VANDEMEULEBROECKE, K.; HOSTE, B.; JANSSEN, P.; KERSTERS, K.; DE VOS, P.; LOGAN, N.A.; ALI, N.; BERKELEY, R.C.W. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a Later Subjective Synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a Subspecies of *P. larvae*, with Emended Descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v. 46, n.1, p. 270-279, 1996a.

EYNRICKX, M.; VANDEMEULEBROECKE, K.; SCHELDEMAN, P.; KERSTERS, K.; DE VOS, P.; LOGAN, N.A.; AZIZ, A.M.; ALI, N.; BERKELEY, R.C.W. A Polyphasic Reassessment of the genus *Paenibacillus*, reclassification of *Bacillus lautus* (Nakamura 1984) as *Paenibacillus lautus* comb. nov. and of *Bacillus peoriae* (Montefusco et al. 1993) as *Paenibacillus peoriae* comb. Nov., and Emended Descriptions of *P. lautus* and of *P. peoriae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.46, n.4, p. 988-1003, 1996b.

EYNRICKX, M.; LEBBE, L.; KERSTERS, K.; DE VOS, P.; FORSYTH, G.; LOGAN, N. A. *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus antofrenticus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus antofrenticus*. **International Journal of Systematic Bacteriology** Spencers Wood, v.48, p. 99-106, 1998.

MEYRIAN, J.; SWINGS, J. 16S rDNA sequence analysis of bacterial isolates from deteriorated mural paintings in the Servilia tomb (Necropolis of Carmona, Seville, Spain). **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v.24, n.3, p.417-422, 2001.

MUREL, T.; WAGNER, B.; REINHOLD-HUREK, B. Identification of N<sub>2</sub>-fixing plant- and fungus-associated *Azoarcus* species by PCR-based genomic fingerprints. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.11, p.4331-4339, 1997.

AGOLEIX, S.; BOVE, J. M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium ofreenig disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.44, p.379-386, 1994.

ARVI, G. N.; KURTOVIC, A.; HAY, A. G.; RUSSELL, J. B. The physiological and genetic diversity of bovine *Streptococcus bovis* strains. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.35, p.49-56, 2001.

EDRYEKA, M.; ROUXEL, T.; BALESSENT, M. Rep-PCR based genomic fingerprint of isolates of *Leptosphaeria maculans* from Poland. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.105, p.813-823, 1999.

EON, S.; MYROLD, D. D. Population size and diversity of *Frankia* in soils of *Peonous velutinus* and Douglas-fir stands. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v.33, p.931-941, 2001.

ANZANA, Y.; HARADA, A.; TAKEUCHI, M.; YOKOTA, A.; HARADA, T. *Bacillus curdolanolyticus* sp. nov. and *Bacillus kobensis* sp. nov., which hydrolyse resistant curdlan. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.45, n.3, p.515-521, 1995.

ESSLER, P. S.; BLANK, C.; LEIGH, J. A. The *nif* gene operon of the methanogenic archaeon *Methanococcus marisaludis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.180, n.6, p.1504-1511, 1998.

IM, V.; HONG, Y.; YOO, J.; LEE, W.; CHOI, C.; CHUNG, S. Genetic relationships of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable-number tandem repeat analysis and BOX-PCR genomic fingerprinting. **EMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.207, p.21-27, 2001.

IRSH'EIN, J. D.; PAERL, H. W.; ZEHR, J. Amplification, cloning, and sequencing of a nifH segment from aquatic microorganisms and natural communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.9, p.2645-2650, 1991.

LEE, J. LEE, K. C.; CHANG, Y.; HONG, S. G.; OH, H. W.; PYUN, Y.; BAE, K. *Paenibacillus daejeonensis* sp. nov., a novel alkaliphilic bacterium from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v.52, p.2107-2111, 2002.

EWIS W. M.; SAUNDERS, J. F.; CRUMPAKER, D. W.; BRENDENCKE, C. M. Eutrophication and land use, Lake Dillon, Colorado. **Ecological Studies**, New York, v.46, 202p., 1984.

OUW, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; DE BRIJN, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens and strains generated with repetitive sequences and CR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.7, p.2286-2295, 1994.

UPSK, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, n.14, p.4525-4529, 1992.

MARTI, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBEK, G.; MORRISON, D. A.; BOULNOIS, G. J.; CLAVERY, J. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, n.13, p.3479-3483, 1992.

LEEHN, C.; BJOURSON, A. J.; McMULLAN, G. *Paenibacillus azoreducens* sp. nov., a synthetic azo dye decolorizing bacterium from industrial wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v.51, p. 1681-1685, 2001.

MOATA, G.; FOSTER, J. W. Nitrogen metabolism In: MOATA, A. G. FOSTER, J. W. (eds.) **Microbial Physiology**. New York: Wiley-Liss, 1995. p. 436-461.

YAKAMURA, L. K. *Paenibacillus apiarius* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.46, n.3, p. 688-693, 1996.



NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Ecologia das Bactérias Diazotróficas nos Solos Tropicais In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (eds.) **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 1998. p.15-60.

NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E. (eds.) **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p.3-8.

OHKUMA, M.; NODA, S.; KUDO, T. Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.11, p. 4926-4934, 1999.

OVERWEG, K.; HERMANS, P. W. M.; TRZCINSKI, K.; SLUIJTER, M.; de GROOT, R.; HRYNIEWICZ, W. Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Poland: Identification of emerging clones. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n.6, p.1739-1745, 1999.

PETTERSSON, B.; RIPPERE, K. E.; YOUSTEN, A. A.; PRIEST, F. G. Transfer of *Bacillus lentimorbus* and *Bacillus popilliae* to the genus *Paenibacillus* with emended descriptions of *Paenibacillus lentimorbus* comb. nov. and *Paenibacillus popilliae* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.49, p. 531-540, 1999.

RAASKA, L.; SILLANPÄÄ, J.; SJÖBERG, A.; SUIHKO, M. Potential microbiological hazards in the production of refined paper products for food applications. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Boston, v.28, p.225-231, 2002.

RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; DE BRUIJN, F. J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprint. In: AKKERMANS, A. D. L.; van ELSAS, J. D.; DE BRUIJN, F. J. **Molecular Microbial Ecology Manual**, Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. p.1-26.

REVA, O. N.; VYUNITSKAYA, V. A.; REZNIK, S. R.; KOZACHKO, I. A.; SMIRNOV, V. V. Antibiotic susceptibility as a taxonomic characteristic of the genus *Bacillus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.45, n.2, p. 409-411, 1995.

ROSADO, A. S.; SELDIN, L.; WOLTERS, A. C.; van ELSAS, J. D. Quantitative 16S rDNA-targeted polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization for the detection of *Paenibacillus azotofixans* in soil and the wheat rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.19, p.153-164, 1996.

ROSADO, A. S.; van ELSAS, J. D.; SELDIN, L. Reclassification of *Paenibacillus durum* (formerly *Clostridium durum* Smith and Cato 1974) Collins et al. 1994 as a Member of the Species *P. azotofixans* (formerly *Bacillus azotofixans* Seldin et al. 1984) Ash et al. 1994. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.47, n.2, p. 569-572, 1997.

ROSADO, A.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; van ELSAS, J.D. Genetic Diversity of *nifH* Gene Sequences in *Paenibacillus azotofixans* Strains and Soil Samples Analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR- Amplified Gene Fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.8, p. 2770-2779, 1998.

RÖSSLER, D.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H.; LIN, C.; MCGILL, T. J.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK, P.; FOX, G. E. Phylogenetic diversity in the genus *Bacillus* as seen by 16S rRNA sequencing studies. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.14, p.266-269, 1991.

RUDNICK, P.; MELETZUS, D.; GREEN, A.; HE, L.; KENNEDY, C. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. **Soil Biology and Biochemistry** Amsterdam, v.29, n.5/6, p.831-841, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SELDIN, L.; van ELSAS, J. D.; PENIDO, E. G. C. *Bacillus* nitrogens fixers from Brazilian soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.70, p.243-255, 1983.

SELDIN, L.; ROSADO, A.; CRUZ, D.W.; NOBREGA, A.; van ELSAS, J.D.; PAIVA, E. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* Strains Isolated from Rhizoplane, Rhizosphere and Non-Root-Associated Soil from Maize Planted in Two Different Brazilian Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.10, p. 3860-3868, 1998.

SHIDA, O.; TAKAGI, H.; KIYOSHI, K.; KOMAGATA, K. Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. **International**

**Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.46, n.4, p. 939-946, 1996.

SHIDA, O.; TAKAGI, H.; KODOWAKI, K.; NAKAMURA, L.K.; KOMAGATA, K. Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *B. kobensis* and *Bacillus thiaminolyticus* to the Genus *Paenibacillus* and Emended Description of the Genus *Paenibacillus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.47, n.2, p. 289-298, 1997a.

SHIDA, O.; TAKAGI, H.; KODOWAKI, K.; NAKAMURA, L.K.; KOMAGATA, K. Emended description of *Paenibacillus amylolyticus* and description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.47, n.2, p. 299-306, 1997b.

SIEFERT, J. L.; LARIOS-SANZ, M.; NAKAMURA, L. K.; SLEPECKY, R. A.; PAUL, J. H.; MOORE, E. R.; FOX, G. E.; JURTSCHUK, P. Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. **Current Microbiology**, New York, v.41, n.2, p.84-88, 2000.

SILVA, K. R. A.; RABINOVITCH, L.; SELDIN, L. Phenotypic and genetic diversity among *Bacillus sphaericus* strains isolated in Brazil, potentially useful as biological control agents against mosquito larvae. **Research in Microbiology**, Paris, v.150, p.153-160, 1999.

SMITH, J. J.; OFFORD, L. C.; HOLDERNESS, M.; SADDLER, G. S. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.12, p. 4263-4268, 1995.

SNELLING, A. M.; GERNER-SMIDT, P.; HAWKEY, P. M.; HERITAGE, J.; PARNELL, P.; PORTER, C.; BODENHAM, A. R.; INGLIS, T. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, n.5, p.1193-1202, 1996.

SPRING, S.; LUDWIG, W.; MARQUEZ, M. C.; VENTOSA, A.; SCHLEIFER, K. *Halobacillus* gen. nov., with descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and

*Halobacillus trueperi* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.46, n.2, p. 492-496, 1996.

TAKEDA, M.; KAMAGATA, Y.; SHINMARU, S.; NISHIYAMA, T.; KOIZUMI, J. *Paenibacillus koleovorans* sp. nov., able to grow on the sheath of *Sphaerotilus natans*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v.52, p. 1597-1601, 2002.

CHER'AKOV, M.; BEM-JACOB, E.; GUTNICK, D. L. *Paenibacillus andritiformis* sp. nov., proposal for a new pattern-forming species and its localization within a phylogenetic cluster. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.49, p. 239-246, 1999.

TIMMUK, S.; NICANDER, B.; GRANHALL, U.; TILLBERG, E. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v.31, p.1847-1852, 1999.

van BELKUM, A.; SLUIJTER, M.; GROOT, R. DE; VERBRUGH, H.; HERMANS, W. M. Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, n.5, p.1176-1179, 1996.

van BELKUM, A.; SCHERER, S.; van ALPHEN, L.; VERBRUGH, H. Short-squence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.62, n.2, p.275-293, 1998.

van der MAAREL, M. J. E. C.; VEEN, A.; WIJBENGA, D. J. *Paenibacillus ganivorans* sp. nov., a new *Paenibacillus* species which degrades native potato starch granules. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.23, p.344-38, 2010.

VERSAIOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v.5, p.25-40, 1994.

VERSAIOVIC, J.; de BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprint of bacterial genomes. In: de BRUIJN, F. J.;

LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. (eds) **Bacterial Genomes Physical Structure and Analysis**. New York: Chapman & Hall, 1998, p.437-454.

VINUESA, P.; RADEMAKER, J. L. W.; de BRUIJN, F. J.; WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.6, p. 2096-2104, 1998.

von der WEID, I.; PAIVA, E.; NÓBREGA, A.; van ELSAS, J.D.; SELDIN, L. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of maize planted in Cerrado soil. **Research in Microbiology**, Paris, v.151, p.369-381, 2000.

von der WEID, I.; DUARTE, G. F.; van ELSAS, J.D.; SELDIN, L. *Paenibacillus brasiliensis* sp. nov., a new nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v.52, p.2147-2153, 2002.

WAGNER-DÖBLER, I.; LÜNSDORF, H.; LÜBBEHÜSEN, T.; von CANSTEIN, H. F.; LI, Y. Structure and species composition of mercury-reducing biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.10, p. 4559-4563, 2000.

WINTZINGERODE, F. V.; GÖBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.21, p.213-229, 1997.

XU, D.; CÔTÉ, J. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood. Não publ.

YOON, J.; YIM, D. K.; LEE, J.; SHIN, K.; SATO, H. H.; LEE, S. T.; PARK, Y. K.; PARK, Y. *Paenibacillus campinasensis* sp. nov., a new cyclodextrin-producing bacterium isolated in Brazil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v.48, p. 833-837, 1998.

YOON, J.; SEO, W.; SHIN, Y. K.; KHO, Y. H.; KANG, K. H.; PARK, Y. *Paenibacillus chinjuensis* sp. nov., a novel exopolysaccharide-producing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v.52, p. 415-421, 2002.

ZANI, S.; MELLON, M. T.; COLLIER, J. L.; ZEHR, J. P. Expression of *nifH* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase. PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.7, p. 3119-3124, 2000.

ZAVAGLIA, A. G.; URRAZA, P.; DeANTONI, G. Characterization of *Bifidobacterium* strains using Box primers. **Anaerobe**, Amsterdam, v.6, p.169-177, 2000.

ZEHR, J. P.; McREYNOLDS, L. A. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, n.10, p. 2522-2526, 1989.

ZEHR, J. P.; MELLON, M.; BRAUN, S.; LITAKER, W.; STEPPE, T.; PAERL, H. W. Diversity of heterotrophic nitrogen fixation genes in a marine cyanobacterial mat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.7, p. 2527-2532, 1995.

ZEHR, J. P.; BRAUN, S.; CHEN, Y.; MELLON, M. Nitrogen fixation in the marine environment: relating genetic potential to nitrogenase activity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v.203, p.61-73, 1996.

ZEHR, J. P.; CARPENTER E. J.; VILLAREAL, T. A. New perspectives on nitrogen-fixing microorganisms in tropical and subtropical oceans. **Trends in Microbiology**, Amsterdam, v.8, n.2, p.68-73, 2000.

## 9. APÊNDICES

## 9.1 Meios de cultura para crescimento, isolamento e identificação

### 9.1.1 Água Peptonada Tamponada (Merck)

Peptona .....	10,0g
Cloreto de Sódio.....	5,0g
Tampão Fosfato .....	10,5g
Água destilada .....	1000ml

### 9.1.2 Ágar Tiamina-Biotina (TB)

D(+) glicose .....	5,0g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,2g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O .....	0,04g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,005g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,15g
Tiamina .....	0,001g
Biotina .....	0,001g
Tioglicolato de sódio .....	0,5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,8g
Solução Micronutriente de Jurgensen .....	1ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	2,86g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O .....	1,81g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,22g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O .....	0,08g



Água destilada .....	1000ml
Ágar .....	15,0g
Água destilada .....	1000ml

#### 9.1.3 Ágar Trypticaseína de Soja (TSA) (Merck)

Peptona de caseína .....	15,0g
Peptona de farinha de soja .....	5,0g
Cloreto de sódio .....	5,0g
Ágar .....	15,0g
Água destilada .....	1000ml

#### 9.1.4 Caldo Lactosado

Peptona .....	10g
Lactose .....	10g
Água destilada .....	1000ml

#### 9.1.5 Ágar Vermelho Neutro

Peptona bacteriológica (Biobrás) .....	10,0g
Amido .....	10,0g
Vermelho neutro .....	0,05g
Ágar .....	12,0g
Água destilada .....	1000ml

#### 9.1.6 Caldo Tripticaseína de Soja (TSB) (Merck)

Peptona de caseína .....	17,0g
Peptona de farinha de soja .....	3,0g
D(+) glicose .....	2,5g
Cloreto de sódio .....	5,0g
Fosfato de hidrogênio dipotássico .....	2,5g
Água destilada .....	1000ml

#### 9.1.7 Meio Tioglicolato (Merck)

Peptona de caseína .....	15,0g
Extrato de levedura .....	5,0g
D(+) glicose .....	5,5g
L(+) cisteína .....	0,5g
Cloreto de sódio .....	2,5g
Tioglicolato de sódio .....	0,5g
Sódio resazurin .....	0,001g
Ágar .....	0,75g
Água destilada .....	1000ml

#### 9.1.8 Reativo de Kovac's para Oxidase

N,N,N,N Tetrametil p-fenilenediamina .....	1%
--	----

#### 9.1.9 Caldo Nitrato (Difco)

Extrato de carne .....	3,0g
------------------------	------

Peptona .....	5,0g
Nitrato de potássio .....	1,0g
Água destilada .....	1000ml

#### 9.1.10 Meio SIM

Caseína digerida por enzimas pancreáticas .....	20,0g
Tecido animal digerido por enzimas pépticas .....	6,1g
Sulfato ferroso de amônio .....	0,2g
Ágar .....	3,5g
Água destilada .....	1000ml

#### 9.1.11 Ágar Caseína

##### Solução A:

Leite em pó desnatado .....	10,0g
Água destilada .....	100ml

##### Solução B:

Ágar .....	2,0g
Água destilada .....	100ml

#### 9.1.12 Ágar Amido

Amido solúvel .....	10,0g
Peptona .....	5,0g
Extrato de carne .....	3,0g
Cloreto de sódio .....	5,0g

Ágar .....	20,0g
Água destilada .....	1000ml

#### 9.1.13 Caldo Uréia (Difco)

Extrato de levedura .....	0,1g
Fosfato monobásico de potássio .....	9,1g
Fosfato dibásico de potássio .....	9,5g
Uréia .....	20,0g
Vermelho de fenol .....	0,01g
Água destilada .....	1000ml

#### 9.1.14 Ágar Citrato seg. Simmons (Merck)

Amônio di-hidrogenofosfato .....	1,0g
Di-potássio hidrogenofosfato .....	1,0g
Cloreto de sódio .....	5,0g
Citrato de sódio .....	2,0g
Sulfato de magnésio .....	0,2g
Azul de bromotimol .....	0,08g
Ágar .....	12,0g
Água destilada .....	1000ml

#### 9.1.15 Caldo TSB (Merck) com 5% NaCl

Peptona de caseína .....	17,0g
Peptona de farinha de soja .....	3,0g

D(+) glicose .....	2,5g
Cloreto de sódio .....	50,0g
Fosfato de hidrogênio dipotássico .....	2,5g
Água destilada .....	1000ml

#### 9.1.16 Gelatina Nutriente

Extrato de carne .....	3,0g
Peptona .....	5,0g
Gelatina .....	120,0g
Água destilada .....	1000ml

#### 9.1.17 Meio Base para Carboidratos

Peptona .....	10,0g
Cloreto de sódio .....	5,0g
Carboidrato .....	10,0g(salicina 5,0g)
Vermelho de fenol .....	0,018g
Água destilada .....	1000ml

#### 9.1.18 Ágar Fenilalanina

D-L Fenilalanina .....	2,0g
Extrato de levedura .....	3,0g
Cloreto de sódio .....	5,0g
Fosfato de sódio .....	1,0g
Ágar .....	12,0g

Água destilada ..... 1000ml

#### 9.1.19 Ágar Esculina

Extrato de levedura ..... 5,0g

Caldo TSB ..... 5,0g

Esculina ..... 1,0g

Citrato férrico amoniaco ..... 0,5g

Ágar ..... 15,0g

Água destilada ..... 1000ml

#### 9.1.20 Meio TY

Triptona ..... 5,0g

Extrato de levedura ..... 3,0g

Cloreto de cálcio ..... 0,87g

Água destilada ..... 1000ml

### 9.2 Soluções utilizadas na extração de DNA total

#### 9.2.1 Tampão de Extração de DNA TES

Tris ..... 10mM

EDTA ..... 25mM

NaCl ..... 150mM

#### 9.2.2 Tampão TE

Tris ..... 10mM

EDTA ..... 25mM

#### 9.2.3 Lisozima (Sigma)

Solução estoque..... 50mg/ml em água Milli-Q estéril

Solução de uso .....20mg/ml em água Milli-Q estéril

Aliquotar e conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 9.2.4 RNase (Gibco-BRL)

Dissolver em uma solução de Tris/HCl 10mM e NaCl 15mM (pH7,5) na concentração de 10mg/ml. Aquecer à  $100^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e deixar atingir lentamente a temperatura ambiente.

#### 9.2.5 Dodecilsulfato de sódio (SDS) (Synth)

Dodecilsulfato de sódio ..... 20g

Água destilada ..... 100ml

#### 9.2.6 Proteinase K (Gibco-BRL)

Solução de uso .....20mg/ml em água Milli-Q estéril

#### 9.2.7 Fenol (Invitrogen)

Fenol tamponado para pH7,8 com os seguintes reagentes:

Fenol ..... 250ml

Água destilada ..... 50ml

Tris/HCl 1M (pH8) ..... 6ml

8-Hidroxiquinolona .....	0,25g
m-cresol .....	12,5ml
$\beta$ -mercaptoetanol .....	0,5ml
NaOH 1N .....	7,5ml
NaOH em pastilhas para o ajuste de pH	

#### 9.2.8 Fenol + Clorofórmio/Álcool Isoamílico

Volume de 1:1

#### 9.2.9 Clorofórmio/Álcool Isoamílico

Volume de 24:1

#### 9.2.10 Tampão TE2

Tris ..... 10mM

EDTA ..... 1mM

### 9.3 Soluções utilizadas para corrida em gel de agarose

#### 9.3.1 Gel de agarose

Agarose ..... 0,8g (gel 0.8%) ou 1g (gel 1%)

Tampão TAE ou TBE ..... 100ml

#### 9.3.2 Solução de brometo de etídeo

Brometo de etídeo ..... 0,50mg

Álcool etílico ..... 1000ml



Concentração de estoque: 10mg/ml

Concentração de uso: 0,5µg/ml

### 9.3.3 Tampão TAE 50X

Tris .....	242g
Ácido Acético Glacial .....	57,1ml
EDTA 0,5M (pH8) .....	100ml
Água destilada .....	1000ml

Concentração de uso: 1X.

### 9.3.4 Tampão TBE 5X

Tris .....	54g
Ácido Bórico .....	27,5g
EDTA 0,5M (pH8) .....	20ml
Água destilada .....	1000ml

Concentração de uso: 0,5X.

### 9.3.5 Tampão de Amostra

Azul de bromofenol .....	0,25%
Glicerol em água .....	30%

## 9.4 Soluções para PCR

9.4.1 Dideoxynucleotídeos Trifosfatados (dNTPs 100mM) (Amersham Biosciences)

dGTP .....	5 $\mu$ l
dCTP .....	5 $\mu$ l
dATP .....	5 $\mu$ l
dTTP .....	5 $\mu$ l
Água Milli-Q estéril .....	180 $\mu$ l

Concentração de uso: 2,5mM

9.4.2 Tampão de reação da *Taq* DNA polimerase 10X (Invitrogen)

Tris/HCl (pH8,4) .....	200mM
KCl .....	500mM

Concentração de uso: 1X

9.4.3 Soro albumina bovina (BSA) (Amersham Biosciences)

Soro albumina bovina .....	4 $\mu$ l
Água Milli-Q estéril .....	96 $\mu$ l

Concentração de uso: 8ng/ $\mu$ l

### 9.5 Matriz dos coeficientes de similaridade obtidos entre os isolados de *Paenibacillus* provenientes de amostras de água

Isolados	204	32	28	29	29M	5	AC	8
204	1							
32	0,625	1						
28	0,222	0,364	1					
29	0,235	0,19	0,696	1				
29M	0	0,25	0,556	0,235	1			
5	0,25	0,4	0,727	0,667	0,625	1		
AC	0,222	0,364	0,667	0,522	0,333	0,545	1	
8	0,222	0,364	0,5	0,522	0,333	0,455	0,667	1
111	0,182	0,4	0,235	0,25	0	0,267	0,353	0,235
17b	0,444	0,545	0,417	0,435	0,222	0,455	0,417	0,417
11	0,333	0,455	0,667	0,435	0,444	0,636	0,583	0,333
24/Mar	0,4	0,737	0,476	0,4	0,267	0,421	0,571	0,476
168	0,462	0,471	0,316	0,333	0	0,353	0,316	0,105
112	0,429	0,444	0,4	0,211	0,143	0,222	0,4	0,3
10M	0,316	0,609	0,48	0,25	0,211	0,435	0,48	0,32
172	0,429	0,444	0,4	0,211	0,143	0,222	0,4	0,3
16	0,353	0,476	0,522	0,455	0,235	0,476	0,435	0,609
189	0,211	0,348	0,48	0,417	0,316	0,435	0,56	0,48
23M	0,4	0,526	0,381	0,4	0,267	0,526	0,476	0,381
79	0,167	0,25	0,444	0,471	0,167	0,5	0,444	0,111
18	0,5	0,5	0,545	0,476	0,125	0,5	0,364	0,364
19	0,429	0,333	0,4	0,421	0,143	0,222	0,3	0,5
23	0,333	0,375	0,444	0,353	0,167	0,375	0,556	0,333
169	0,375	0,5	0,636	0,476	0,25	0,4	0,545	0,636
39Mar	0,222	0,545	0,417	0,261	0,333	0,455	0,583	0,417
37	0,308	0,353	0,421	0,333	0,308	0,353	0,632	0,632
125	0,308	0,353	0,421	0,333	0,308	0,353	0,632	0,632
32M	0,25	0,6	0,545	0,381	0,5	0,7	0,545	0,455
191	0,222	0,455	0,5	0,522	0,222	0,545	0,583	0,667
171	0,267	0,421	0,095	0,2	0,133	0,211	0,19	0,381
5N	0,267	0,316	0,381	0,3	0,133	0,211	0,381	0,476
21	0,5	0,5	0,455	0,381	0,125	0,4	0,364	0,364
4IN	0,308	0,471	0,211	0,333	0,154	0,353	0,421	0,316
6	0,333	0,375	0,222	0,235	0	0,125	0,556	0,444
26	0,353	0,286	0,435	0,364	0,353	0,381	0,348	0,435
ATCC 6344	0,2	0,333	0,385	0,4	0,1	0,167	0,231	0,385
ATCC 842	0	0	0,19	0,4	0,133	0,105	0,286	0,381

**9.5** Matriz dos coeficientes de similaridade obtidos entre os isolados de *Paenibacillus* provenientes de amostras de água (continuação)

Isolados	111	17b	11	24/Mar	168	112	10M	172
204								
32								
28								
29								
29M								
5								
AC								
8								
111	1							
17b	0,588	1						
11	0,235	0,333	1					
24/Mar	0,429	0,571	0,476	1				
168	0,667	0,526	0,211	0,375	1			
112	0,615	0,5	0,3	0,353	0,667	1		
10M	0,444	0,48	0,48	0,545	0,4	0,476	1	
172	0,615	0,5	0,3	0,353	0,667	1	0,476	1
16	0,5	0,609	0,348	0,5	0,444	0,526	0,5	0,526
189	0,333	0,48	0,32	0,364	0,4	0,286	0,385	0,286
23M	0,714	0,762	0,381	0,556	0,625	0,588	0,455	0,588
79	0,727	0,556	0,333	0,4	0,769	0,429	0,316	0,429
18	0,4	0,364	0,545	0,316	0,471	0,556	0,522	0,556
19	0,308	0,2	0,2	0,353	0,4	0,5	0,19	0,5
23	0,727	0,556	0,333	0,4	0,615	0,571	0,421	0,571
169	0,533	0,545	0,364	0,526	0,471	0,667	0,435	0,667
39Mar	0,235	0,417	0,583	0,381	0,211	0,2	0,48	0,2
37	0,333	0,421	0,316	0,5	0,286	0,267	0,3	0,267
125	0,333	0,421	0,316	0,5	0,286	0,267	0,3	0,267
32M	0,667	0,727	0,545	0,632	0,471	0,444	0,609	0,444
191	0,471	0,583	0,417	0,476	0,316	0,3	0,56	0,3
171	0,429	0,571	0,095	0,333	0,25	0,235	0,455	0,235
5N	0	0,381	0,381	0,333	0	0,118	0,273	0,118
21	0,267	0,545	0,455	0,316	0,353	0,444	0,348	0,444
4IN	0,167	0,211	0,211	0,25	0,286	0,133	0,3	0,133
6	0,182	0,222	0,222	0,4	0,308	0,143	0,211	0,143
26	0,125	0,261	0,261	0,2	0,333	0,316	0,167	0,316
ATCC 6344	0,211	0,385	0,154	0,435	0,286	0,364	0,222	0,364
ATCC 842	0	0	0	0,111	0	0,118	0,091	0,118

**9.5 Matriz dos coeficientes de similaridade obtidos entre os isolados de *Paenibacillus* provenientes de amostras de água (continuação)**

Isolados	16	189	23M	79	18	19	23	169
204								
32								
28								
29								
29M								
5								
AC								
8								
111								
17b								
11								
24/Mar								
168								
112								
10M								
172								
16	1							
189	0,5	1						
23M	0,7	0,455	1					
79	0,353	0,421	0,667	1				
18	0,476	0,261	0,526	0,375	1			
19	0,421	0,286	0,353	0,286	0,667	1		
23	0,471	0,526	0,667	0,667	0,375	0,286	1	
169	0,857	0,522	0,632	0,375	0,5	0,556	0,625	1
39Mar	0,348	0,64	0,381	0,222	0,364	0	0,333	0,273
37	0,444	0,6	0,5	0,308	0,235	0,4	0,615	0,471
125	0,444	0,6	0,5	0,308	0,235	0,4	0,615	0,471
32M	0,667	0,522	0,842	0,625	0,5	0,222	0,625	0,6
191	0,696	0,48	0,571	0,333	0,455	0,3	0,444	0,545
171	0,5	0,545	0,556	0,267	0,316	0,235	0,4	0,316
5N	0,5	0,455	0,222	0	0,211	0,118	0,133	0,316
21	0,571	0,348	0,526	0,25	0,5	0,222	0,375	0,5
4IN	0,222	0,3	0,375	0,154	0,353	0,133	0,308	0,235
6	0,353	0,421	0,4	0,167	0,25	0,286	0,333	0,375
26	0,455	0,583	0,4	0,235	0,476	0,526	0,353	0,476
ATCC 6344	0,4	0,444	0,261	0,2	0,25	0,364	0,3	0,5
ATCC 842	0,1	0,273	0	0	0,105	0,353	0,133	0,211

**9.5 Matriz dos coeficientes de similaridade obtidos entre os isolados de *Paenibacillus* provenientes de amostras de água (continuação)**

Isolados	39Mar	37	125	32M	191	171	5N	21
204								
32								
28								
29								
29M								
5								
AC								
8								
111								
17b								
11								
24/Mar								
168								
112								
10M								
172								
16								
189								
23M								
79								
18								
19								
23								
169								
39Mar	1							
37	0,421	1						
125	0,421	1	1					
32M	0,545	0,471	0,471	1				
191	0,5	0,632	0,632	0,636	1			
171	0,381	0,375	0,375	0,526	0,476	1		
5N	0,571	0,5	0,5	0,211	0,571	0,444	1	
21	0,545	0,353	0,353	0,4	0,455	0,316	0,632	1
4IN	0,526	0,286	0,286	0,353	0,421	0,25	0,125	0,235
6	0,444	0,615	0,615	0,25	0,444	0,267	0,4	0,25
26	0,435	0,444	0,444	0,381	0,348	0,3	0,3	0,286
ATCC 6344	0,231	0,286	0,286	0,25	0,308	0,261	0,348	0,25
ATCC 842	0,095	0,25	0,25	0	0,19	0,111	0,111	0

**9.5 Matriz dos coeficientes de similaridade obtidos entre os isolados de *Paenibacillus* provenientes de amostras de água (continuação)**

Isolados	4IN	6	26	ATCC 6344	ATCC 842
204					
32					
28					
29					
29M					
5					
AC					
8					
111					
17b					
11					
24/Mar					
168					
112					
10M					
172					
16					
189					
23M					
79					
18					
19					
23					
169					
39Mar					
37					
125					
32M					
191					
171					
5N					
21					
4IN	1				
6	0,615	1			
26	0,556	0,471	1		
ATCC 6344	0,19	0,2	0,48	1	
ATCC 842	0,25	0,133	0,3	0,348	1

**9.6 Matriz dos coeficientes de similaridades obtidos entre os isolados de *Paenibacillus* provenientes de amostras de solo**

Isolados	57SOLO	V44SOLO	3SOLO	46SOLO	28SOLO	39SOLO	22SOLO	40SOLO
57SOLO	1							
44SOLO	0,5	1						
3SOLO	0,143	0,5	1					
46SOLO	0,222	0,417	0,444	1				
28SOLO	0,348	0,483	0,435	0,444	1			
39SOLO	0,235	0,435	0,588	0,381	0,615	1		
22SOLO	0,154	0,526	0,308	0,471	0,273	0,25	1	
40SOLO	0,154	0,421	0,154	0,471	0,273	0,25	0,833	1
35SOLO	0,5	0,364	0,375	0,4	0,64	0,737	0,133	0,267
37SOLO	0,333	0,5	0,444	0,545	0,667	0,762	0,235	0,235
21SOLO	0,2	0,385	0,3	0,417	0,483	0,348	0,316	0,421
34SOLO	0,4	0,476	0,133	0,421	0,333	0,222	0,429	0,429
43SOLO	0,286	0,5	0,286	0,222	0,261	0,353	0,462	0,462
4SOLO	0,4	0,846	0,5	0,5	0,483	0,435	0,526	0,526
7SOLO	0,571	0,4	0,286	0,222	0,348	0,353	0	0
19SOLO	0,571	0,593	0,571	0,64	0,533	0,417	0,3	0,3
23SOLO	0,4	0,381	0,667	0,316	0,417	0,556	0,143	0,286
42SOLO	0,5	0,545	0,5	0,3	0,4	0,421	0,4	0,4
33SOLO	0,421	0,56	0,421	0,348	0,714	0,545	0,111	0,111
45SOLO	0,421	0,48	0,421	0,348	0,571	0,364	0,333	0,333
2SOLO	0,3	0,769	0,4	0,5	0,483	0,435	0,526	0,526
12SOLO	0,333	0,667	0,111	0,364	0,37	0,286	0,588	0,588
18SOLO	0,133	0,476	0,267	0,211	0,417	0,333	0,429	0,429
1SOLO	0,308	0,316	0,308	0,353	0,364	0,125	0	0
41SOLO	0,167	0,333	0,167	0,375	0,095	0	0,364	0,364
8SOLO	0,308	0,526	0,308	0,235	0,273	0,375	0,5	0,5
32SOLO	0,571	0,6	0,286	0,333	0,348	0,353	0,462	0,462
38SOLO	0,462	0,316	0,462	0,471	0,455	0,375	0,333	0,333
50SOLO	0,222	0,417	0,556	0,727	0,667	0,571	0,353	0,353
ATCC 6344	0,095	0,37	0,286	0,48	0,4	0,333	0,4	0,4
ATCC 842	0,25	0,182	0	0,3	0,16	0,211	0,133	0,133



**9.6 Matriz dos coeficientes de similaridades obtidos entre os isolados de *Paenibacillus* provenientes de amostras de solo (continuação)**

Isolados	35SOLO	37SOLO	21SOLO	34SOLO	43SOLO	4SOLO	7SOLO	19SOLO
57SOLO								
44SOLO								
3SOLO								
46SOLO								
28SOLO								
39SOLO								
22SOLO								
40SOLO								
35SOLO	1							
37SOLO	0,8	1						
21SOLO	0,364	0,333	1					
34SOLO	0,471	0,316	0,476	1				
43SOLO	0,375	0,222	0,5	0,8	1			
4SOLO	0,455	0,5	0,462	0,476	0,5	1		
7SOLO	0,5	0,444	0,3	0,4	0,429	0,5	1	
19SOLO	0,522	0,48	0,444	0,455	0,381	0,741	0,571	1
23SOLO	0,588	0,421	0,571	0,25	0,4	0,476	0,533	0,636
42SOLO	0,444	0,3	0,636	0,471	0,625	0,636	0,625	0,609
33SOLO	0,571	0,609	0,56	0,4	0,421	0,64	0,632	0,692
45SOLO	0,476	0,348	0,56	0,5	0,421	0,56	0,421	0,692
2SOLO	0,455	0,5	0,462	0,476	0,5	0,923	0,4	0,667
12SOLO	0,3	0,364	0,417	0,421	0,444	0,75	0,333	0,48
18SOLO	0,235	0,211	0,476	0,25	0,4	0,571	0,267	0,273
1SOLO	0,267	0,235	0,316	0,286	0,154	0,421	0,615	0,6
41SOLO	0,143	0,125	0,444	0,462	0,5	0,333	0,333	0,316
8SOLO	0,4	0,235	0,526	0,714	0,923	0,526	0,308	0,4
32SOLO	0,625	0,444	0,4	0,8	0,714	0,6	0,429	0,476
38SOLO	0,667	0,471	0,211	0,429	0,308	0,526	0,462	0,6
50SOLO	0,6	0,636	0,5	0,421	0,333	0,417	0,333	0,64
ATCC 6344	0,348	0,4	0,444	0,455	0,286	0,519	0,095	0,429
ATCC 842	0,222	0,2	0,364	0,353	0,25	0,182	0,125	0,261

**9.6** Matriz dos coeficientes de similaridades obtidos entre os isolados de *Paenibacillus* provenientes de amostras de solo (continuação)

Isolados	23SOLO	42SOLO	33SOLO	45SOLO	2SOLO	12SOLO	18SOLO	1SOLO
57SOLO								
44SOLO								
3SOLO								
46SOLO								
28SOLO								
39SOLO								
22SOLO								
40SOLO								
35SOLO								
37SOLO								
21SOLO								
34SOLO								
43SOLO								
4SOLO								
7SOLO								
19SOLO								
23SOLO	1							
42SOLO	0,706	1						
33SOLO	0,5	0,571	1					
45SOLO	0,6	0,667	0,583	1				
2SOLO	0,381	0,545	0,64	0,64	1			
12SOLO	0,211	0,5	0,522	0,522	0,833	1		
18SOLO	0,25	0,588	0,5	0,5	0,667	0,737	1	
1SOLO	0,429	0,4	0,556	0,556	0,421	0,235	0,286	1
41SOLO	0,308	0,571	0,235	0,353	0,333	0,375	0,308	0,364
8SOLO	0,429	0,667	0,444	0,444	0,526	0,471	0,429	0,167
32SOLO	0,4	0,625	0,421	0,421	0,5	0,444	0,267	0,154
38SOLO	0,429	0,4	0,444	0,333	0,421	0,235	0,143	0,333
50SOLO	0,526	0,4	0,522	0,522	0,417	0,273	0,211	0,471
ATCC 6344	0,182	0,261	0,308	0,385	0,519	0,32	0,273	0,3
ATCC 842	0,118	0,222	0,19	0,19	0,182	0,2	0,118	0,133

9.6 Matriz dos coeficientes de similaridades obtidos entre os isolados de *Paenibacillus* provenientes de amostras de solo (continuação)

Isolados	41SOLO	8SOLO	32SOLO	38SOLO	50SOLO	ATCC 6344	ATCC 842
57SOLO							
44SOLO							
3SOLO							
46SOLO							
28SOLO							
39SOLO							
22SOLO							
40SOLO							
35SOLO							
37SOLO							
21SOLO							
34SOLO							
43SOLO							
4SOLO							
7SOLO							
19SOLO							
23SOLO							
42SOLO							
33SOLO							
45SOLO							
2SOLO							
12SOLO							
18SOLO							
1SOLO							
41SOLO	1						
8SOLO	0,545	1					
32SOLO	0,5	0,769	1				
38SOLO	0,182	0,333	0,615	1			
50SOLO	0,375	0,353	0,333	0,471	1		
ATCC 6344	0,211	0,3	0,381	0,4	0,4	1	
ATCC 842	0,143	0,267	0,25	0	0,2	0,348	1

9.7 Matriz dos coeficientes de similaridades obtidos entre os isolados de *Paenibacillus* provenientes de amostras de água e de solo

Isolados	112	172	112	172	168	111	23	169	18	19
112	1									
172	1	1								
168	0,667	0,615	0,667	1						
111	0,615	0,615	0,667	0,615	0,667	1				
23	0,571	0,571	0,667	0,571	0,615	0,727	1			
169	0,667	0,667	0,667	0,667	0,471	0,533	0,625	1		
18	0,556	0,556	0,556	0,556	0,471	0,375	0,625	0,5	1	
19	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,308	0,286	0,556	0,667	1
204	0,429	0,429	0,429	0,462	0,182	0,333	0,375	0,375	0,5	0,429
189	0,286	0,286	0,286	0,4	0,333	0,333	0,522	0,261	0,261	0,286
39Mar	0,2	0,2	0,2	0,211	0,235	0,333	0,273	0,364	0,364	0
41N	0,133	0,133	0,133	0,286	0,167	0,308	0,235	0,353	0,353	0,133
6	0,143	0,143	0,143	0,308	0,182	0,333	0,375	0,375	0,25	0,286
26	0,316	0,316	0,333	0,316	0,125	0,353	0,476	0,476	0,476	0,526
50SOLO	0,105	0,105	0	0,125	0,125	0	0	0,286	0,19	0,105
46SOLO	0,211	0,211	0,111	0,111	0,25	0,118	0,381	0,381	0,286	0,316
28SOLO	0,25	0,25	0,174	0,174	0,286	0,182	0,385	0,381	0,25	0,167
42SOLO	0,118	0,118	0,125	0,125	0,143	0,267	0,421	0,421	0,118	0,167
23SOLO	0	0	0,133	0,133	0	0	0,111	0,364	0,222	0,125
45SOLO	0,2	0,2	0,211	0,211	0,235	0,222	0,364	0,455	0,455	0,3
19SOLO	0,273	0,273	0,286	0,286	0,316	0,2	0,417	0,417	0,417	0,364
38SOLO	0,286	0,286	0,154	0,154	0,364	0,167	0,5	0,125	0,125	0,143
3SOLO	0	0	0,143	0,143	0	0	0,118	0,235	0,235	0,133
1SOLO	0,143	0,143	0,308	0,308	0,182	0,167	0,25	0,25	0,25	0,286
32	0,444	0,444	0,471	0,471	0,4	0,375	0,5	0,5	0,5	0,333
24/Mar	0,353	0,353	0,375	0,375	0,429	0,4	0,526	0,526	0,316	0,353
10M	0,476	0,476	0,4	0,444	0,421	0,435	0,522	0,522	0,522	0,19
AC	0,4	0,4	0,316	0,353	0,556	0,545	0,364	0,364	0,364	0,3
28	0,4	0,4	0,316	0,235	0,444	0,636	0,545	0,545	0,545	0,4
11	0,3	0,3	0,211	0,235	0,333	0,364	0,364	0,364	0,545	0,2
41SOLO	0	0	0	0	0	0,182	0,4	0,267	0,267	0,154
34SOLO	0,125	0,125	0	0	0,154	0,143	0,556	0,556	0,222	0,25
32SOLO	0,133	0,133	0	0	0,167	0,154	0,588	0,588	0,235	0,267
43SOLO	0	0	0	0	0	0,154	0,471	0,471	0,118	0,133
2SOLO	0,381	0,381	0,4	0,444	0,421	0,609	0,435	0,609	0,435	0,381
4SOLO	0,381	0,381	0,4	0,444	0,421	0,609	0,435	0,609	0,435	0,381
44SOLO	0,286	0,286	0,3	0,333	0,316	0,522	0,435	0,522	0,435	0,381
12SOLO	0,421	0,421	0,333	0,333	0,5	0,471	0,571	0,571	0,381	0,316
17b	0,5	0,5	0,526	0,588	0,556	0,545	0,545	0,545	0,364	0,2
191	0,3	0,3	0,316	0,471	0,444	0,545	0,545	0,545	0,455	0,3
18SOLO	0,25	0,25	0,267	0,308	0,429	0,444	0,444	0,444	0,333	0,25
171	0,235	0,235	0,25	0,429	0,4	0,333	0,316	0,316	0,316	0,235
40SOLO	0,286	0,286	0,154	0,364	0,333	0,5	0,5	0,5	0,25	0,286
ATCC6344	0,364	0,364	0,286	0,154	0,211	0,3	0,5	0,5	0,25	0,364
ATCC842	0,118	0,118	0,118	0	0	0,133	0,211	0,211	0,105	0,353

9.7 Matriz dos coeficientes de similaridades obtidos entre os isolados de *Paenibacillus* provenientes de amostras de água e de solo (continuação)

Isolados	204	189	39Mar	4IN	6	26	50SOLO	46SOLO
112								
172								
168								
111								
23								
169								
18								
19								
204	1							
189		1						
39Mar			1					
4IN				1				
6					1			
26						1		
50SOLO							1	
46SOLO								1
28SOLO	0,182	0,345	0,5	0,174	0,091	0,222	0,667	0,444
42SOLO	0,4	0,455	0,571	0,375	0,267	0,4	0,4	0,3
23SOLO	0,143	0,381	0,6	0,4	0,143	0,421	0,526	0,316
45SOLO	0,333	0,4	0,5	0,421	0,111	0,348	0,522	0,348
19SOLO	0,2	0,444	0,462	0,286	0	0,4	0,64	0,64
38SOLO	0	0,316	0,333	0	0	0,235	0,471	0,471
38SOLO	0	0,316	0,333	0	0	0,235	0,471	0,471
3SOLO	0,154	0,3	0,421	0,143	0	0,333	0,556	0,444
1SOLO	0,167	0,316	0,333	0,154	0	0,235	0,471	0,353
32	0,625	0,348	0,545	0,471	0,375	0,286	0,476	0,286
24/Mar	0,4	0,364	0,381	0,25	0,4	0,2	0,4	0,4
10M	0,316	0,385	0,48	0,3	0,211	0,167	0,25	0,167
AC	0,222	0,56	0,583	0,421	0,556	0,348	0,261	0,261
28	0,222	0,48	0,417	0,211	0,222	0,435	0,435	0,435
11	0,333	0,32	0,583	0,211	0,222	0,261	0,435	0,348
41SOLO	0,182	0,333	0,353	0,364	0,375	0,375	0,375	0,375
34SOLO	0,143	0,381	0,3	0,4	0,286	0,316	0,421	0,421
32SOLO	0,154	0,4	0,316	0,286	0,308	0,333	0,333	0,333
43SOLO	0,308	0,4	0,316	0,286	0,308	0,222	0,333	0,222
2SOLO	0,316	0,462	0,32	0,2	0,211	0,333	0,417	0,5
4SOLO	0,316	0,538	0,4	0,2	0,211	0,417	0,417	0,5
44SOLO	0,316	0,462	0,32	0,2	0,211	0,333	0,417	0,417
12SOLO	0,353	0,417	0,261	0,222	0,235	0,273	0,273	0,364
17b	0,444	0,48	0,417	0,211	0,222	0,261	0,348	0,348
191	0,222	0,48	0,5	0,421	0,444	0,348	0,261	0,348
18SOLO	0,429	0,381	0,4	0,133	0,286	0,211	0,211	0,211
171	0,267	0,545	0,381	0,25	0,267	0,3	0,2	0,3
40SOLO	0,333	0,421	0,333	0,308	0,5	0,471	0,353	0,471
ATCC6344	0,2	0,444	0,231	0,19	0,2	0,48	0,4	0,48
ATCC842	0	0,273	0,095	0,25	0,133	0,3	0,2	0,3

9.7 Matriz dos coeficientes de similaridades obtidos entre os isolados de *Paenibacillus* provenientes de amostras de água e de solo (continuação)

Isolados	28SOLO	42SOLO	23SOLO	45SOLO	19SOLO	38SOLO	3SOLO	1SOLO
112	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
172	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
168	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
111	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
23	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
169	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
18	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
19	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
204	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
189	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
39Mar	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
41N	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
6	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
26	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
50SOLO	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
46SOLO	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
28SOLO	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
42SOLO	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
23SOLO	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
45SOLO	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
19SOLO	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
38SOLO	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
3SOLO	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
1SOLO	0,417	0,706	0,667	0,6	1	0,692	0,333	0,6
32	0,385	0,632	0,444	0,636	0,5	0,435	0,375	0,308
24/Mar	0,32	0,556	0,235	0,476	0,4	0,435	0,375	0,308
10M	0,414	0,364	0,19	0,48	0,296	0,211	0,1	0,211
AC	0,286	0,476	0,3	0,333	0,308	0,111	0	0,333
28	0,357	0,476	0,3	0,417	0,462	0,222	0,421	0,444
11	0,357	0,476	0,3	0,417	0,385	0,222	0,316	0,444
41SOLO	0,095	0,571	0,308	0,353	0,316	0,182	0,167	0,364
34SOLO	0,333	0,471	0,25	0,5	0,455	0,429	0,133	0,286
32SOLO	0,348	0,625	0,4	0,421	0,476	0,615	0,286	0,154
32SOLO	0,348	0,625	0,4	0,421	0,476	0,615	0,286	0,154
43SOLO	0,261	0,625	0,4	0,421	0,381	0,308	0,286	0,154
2SOLO	0,483	0,545	0,381	0,64	0,667	0,421	0,4	0,421
4SOLO	0,483	0,636	0,476	0,56	0,741	0,526	0,5	0,421
44SOLO	0,483	0,545	0,381	0,48	0,593	0,316	0,5	0,316
12SOLO	0,37	0,5	0,211	0,522	0,48	0,235	0,111	0,235
17B	0,429	0,381	0,2	0,333	0,538	0,444	0,316	0,222
191	0,429	0,571	0,3	0,5	0,462	0,333	0,316	0,111
18SOLO	0,417	0,588	0,25	0,5	0,273	0,143	0,267	0,286
171	0,32	0,333	0,235	0,381	0,435	0,4	0,25	0
40SOLO	0,273	0,4	0,286	0,333	0,3	0,333	0,154	0
ATCC6344	0,4	0,261	0,182	0,385	0,429	0,4	0,286	0,3
ATCC842	0,16	0,222	0,118	0,19	0,261	0	0	0,133

9.7 Matriz dos coeficientes de similaridades obtidos entre os isolados de *Faenibacillus* provenientes de amostras de água e de solo (continuação)

Isolados	32	24/Mar	10M	AC	28	11	41SOLO	34SOLO
112								
172								
168								
111								
23								
169								
18								
19								
204								
189								
39Mar								
41N								
6								
26								
50SOLO								
46SOLO								
28SOLO								
42SOLO								
23SOLO								
45SOLO								
19SOLO								
38SOLO								
3SOLO								
1SOLO								
32	1							
24/Mar	0,737	1						
10M	0,609	0,545	1					
AC	0,364	0,571	0,48	1				
28	0,364	0,476	0,48	0,667	1			
11	0,455	0,476	0,48	0,583	0,667	1		
41SOLO	0,4	0,571	0,333	0,471	0,588	0,471	1	
34SOLO	0,333	0,471	0,286	0,4	0,4	0,2	0,462	1
32SOLO	0,353	0,5	0,3	0,421	0,421	0,211	0,5	0,8
43SOLO	0,353	0,375	0,2	0,421	0,421	0,211	0,5	0,8
2SOLO	0,435	0,545	0,385	0,48	0,56	0,4	0,333	0,476
4SOLO	0,435	0,545	0,308	0,48	0,56	0,4	0,333	0,476
44SOLO	0,348	0,455	0,308	0,48	0,64	0,4	0,333	0,476
12SOLO	0,381	0,5	0,417	0,522	0,435	0,348	0,375	0,421
17b	0,545	0,571	0,48	0,417	0,417	0,333	0,235	0,3
191	0,455	0,476	0,56	0,583	0,5	0,417	0,353	0,5
18SOLO	0,444	0,471	0,381	0,4	0,4	0,4	0,308	0,25
171	0,421	0,333	0,455	0,19	0,095	0,095	0,143	0,235
40SOLO	0,375	0,4	0,211	0,333	0,222	0,111	0,364	0,429
ATCG6344	0,333	0,435	0,222	0,231	0,385	0,154	0,211	0,455
ATCG842	0	0,111	0,091	0,286	0,19	0	0,143	0,353

9.7 Matriz dos coeficientes de similaridades obtidos entre os isolados de *Paenibacillus* provenientes de amostras de água e de solo (continuação)

Isolados	32SOLO	43SOLO	2SOLO	4SOLO	44SOLO	12SOLO	17b	191
112								
172								
168								
111								
23								
169								
18								
19								
204								
189								
39Mar								
41N								
6								
26								
50SOLO								
46SOLO								
28SOLO								
42SOLO								
23SOLO								
45SOLO								
19SOLO								
38SOLO								
3SOLO								
1SOLO								
32								
24/Mar								
10M								
AC								
28								
11								
41SOLO								
34SOLO								
32SOLO	1							
43SOLO	0,714	1						
2SOLO	0,5	0,5	1					
4SOLO	0,6	0,5	0,923	1				
44SOLO	0,6	0,5	0,769	0,846	1			
12SOLO	0,444	0,444	0,833	0,75	0,667	1		
17b	0,421	0,316	0,64	0,72	0,72	0,609	1	
191	0,632	0,421	0,64	0,64	0,64	0,609	0,583	1
18SOLO	0,267	0,4	0,667	0,571	0,476	0,737	0,4	0,5
171	0,375	0,25	0,455	0,455	0,364	0,5	0,571	0,476
40SOLO	0,462	0,462	0,526	0,526	0,421	0,588	0,444	0,333
ATCC6344	0,381	0,286	0,519	0,519	0,37	0,32	0,385	0,308
ATCC842	0,25	0,25	0,182	0,182	0,182	0,2	0	0,19



**9.7** Matriz dos coeficientes de similaridades obtidos entre os isolados de *Paenibacillus* provenientes de amostras de água e de solo (continuação)

Isolados	18SOLO	171	40SOLO	ATCC 6344	ATCC 842
112					
172					
168					
111					
23					
169					
18					
19					
204					
189					
39Mar					
41N					
6					
26					
50SOLO					
46SOLO					
28SOLO					
42SOLO					
23SOLO					
45SOLO					
19SOLO					
38SOLO					
3SOLO					
1SOLO					
32					
24/Mar					
10M					
AC					
28					
11					
41SOLO					
34SOLO					
32SOLO					
43SOLO					
2SOLO					
4SOLO					
44SOLO					
12SOLO					
17b					
191					
18SOLO	1				
171	0,353	1			
40SOLO	0,429	0,533	1		
ATCC6344	0,273	0,261	0,4	1	
ATCC842	0,118	0,111	0,133	0,348	1

Rua Ramiro Barcelos, 2705 - 2º andar  
E-mail: grafica@ufrgs.br

