



**POTENCIAL MICROBIOLÓGICO EM ÁREA DE FLORESTA E PASTAGEM:
ESTUDO DE CASO DO *Bacillus Cereus* NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO SÃO
FRANCISCO - AMAZÔNIA SUL OCIDENTAL**

Adriana Cristina da Silva Nunes¹, Adriely Ferreira da Costa Nery², Selma Maria de Arruda
Silva³, Najla Benevides Matos⁴

(1 – Universidade Federal de Rondônia, Docente, adriananunes@unir.br; 2 – Universidade de
Federal de Rondônia, Bacharel em Biologia, adriely_nery@hotmail.com; 3 – Laboratório de
Geografia e Planejamento Ambiental, Mestre em Geografia, selmaprofgeo@hotmail.com; 4 –
Fundação Oswaldo Cruz, Pesquisadora, najlamatos@fiocruz.br)

Resumo: A bacia do rio São Francisco constitui um reservatório natural de vida e proliferação de bactérias no solo. O objetivo foi identificar o *Bacillus cereus* em amostras de solo. A hipótese da pesquisa foi pautada na influência do processo de desmatamento, que desencadeia o fator de virulência do *B. cereus* em área de pasto, comparado com área de floresta independente do tipo de solo. A coleta foi realizada em áreas de floresta e de pastagem na profundidade de 0-20cm. Os atributos analisados foram pH, MO, P, K, Ca, Mg, H+Al, Al, CTC, m, v, Cu, Fe, Mn e Zn. O isolamento do *B. cereus* seguiu o método clássico descrito pela *World Organization* (1985). A presença da bactéria foi detectada através da extração de DNA a partir do método de Fenol Clorofórmio, seguido da técnica de PCR, e eletroforese. O resultado para a classificação textural foram Latossolo Vermelho Amarelo, Neossolo Litólico, e Argissolo Vermelho Amarelo, cujo pH variou de 4,6 a 4,7. Em área de floresta o desvio padrão foi de 24,3 demonstrando dispersão significativa quanto à matéria orgânica. A mesma tipologia de solo pode não ser fator determinante para indicar a presença do *B. cereus* quanto ao gene *nheB*.

Palavras-chave: Solo, Macronutrientes, Bactéria.



MICROBIOLOGICAL POTENTIAL IN FOREST AND PASTURE AREAS: A CASE STUDY ABOUT *Bacillus Cereus* IN SÃO FRANCISCO RIVER BASIN - SOUTHWESTERN AMAZON

Abstract: São Francisco River basin is a natural reservoir for bacterial life and proliferation in the soil. The aim of the current study is to identify *Bacillus cereus* specimens in soil samples. The research hypothesis was based on the influence of deforestation processes, which trigger the virulence factor of *B. cereus* in pasture areas, in comparison to forest areas, regardless of soil type. Soil samples were collected 0-20cm down the ground in forest and pasture areas. The analyzed attributes comprised pH, MO, P, K, Ca, Mg, H + Al, Al, CTC, m, v, Cu, Fe, Mn and Zn. *B. cereus* isolation process was based on the classical method described by the World Organization (1985). Bacterial incidence was determined through DNA extraction based on the Phenol Chloroform method, which was followed by techniques such as PCR and electrophoresis. Soil textural classification pointed out the following soil types: Red Yellow Latosols, Litolic Neosols, and Yellow Red Latosols, whose pH ranged from 4.6 to 4.7. The standard deviation in the forest area was 24.3; this outcome has shown significant organic matter dispersion. Similar soil typology may not be a determining factor to indicate *B. cereus* incidence based on the *nheB* gene.

Keywords: Soil, Macronutrients, Bacteria.

POTENCIAL MICROBIOLÓGICO EN ZONA BOSCOSA Y PASTIZAL: ESTUDIO DE CASO DEL *Bacillus Cereus* EN LA CUENCA HIDROGRÁFICA DEL RÍO DE SAN FRANCISCO – AMAZONÍA SUR OCCIDENTAL

Resumen: La cuenca del río San Francisco constituye un reservorio natural de vida y proliferación de bacterias en el suelo. El objetivo fue identificar el *Bacillus cereus* en muestras de suelo. La hipótesis de la investigación se basó en la influencia del proceso de deforestación, que desencadena el factor de virulencia de *B. cereus* en áreas de pastos, comparado con la área forestal independiente del tipo de suelo. La colecta fue realizada en áreas forestales y pastizales a una profundidad de 0-20cm. Los atributos analizados fueron pH, MO, P, K, Ca, Mg, H+Al, Al, CTC, m, v, Cu, Fe, Mn y Zn. El aislamiento de *B. cereus* siguió el método clásico descrito por la *World Organization* (1985). La presencia de la



bacteria se detectó mediante la extracción de ADN a partir del método Fenol Cloroformo, seguido de la técnica PCR, y la electroforesis. El resultado para la clasificación textural fueron Latosol Rojo Amarillo, Neosol Litólico y Acrisol Rojo Amarillo, cuyo pH varió entre 4,6 y 4,7. En el área forestal, la desviación estándar fue de 24,3, lo que demuestra una dispersión significativa con respecto a la materia orgánica. La misma tipología del suelo puede no ser un factor determinante para indicar la presencia de *B. cereus* con respecto al gen *nheB*.

Palabras clave: Suelo, Macronutrientes, Bacteria.

INTRODUÇÃO

As investigações física, química e biológica do solo permitem entender a dinâmica ecológica na qual os microrganismos estão inseridos. Desta forma, o *Bacillus cereus*, enquanto bactéria gram-positiva, preferencialmente aeróbia com crescimento facultativo anaeróbio presente no solo, desenvolve seu ciclo de vida saprofítico, germinando e crescendo em associação com animais ou plantas, o que resulta em interações simbióticas e/ou patogênicas de forma cosmopolita (SANTOS 2009). Ele pertence ao gênero *Bacillus*, filo Firmucutes, apresentando maior correlação em áreas de pastagem em detrimento de florestas (VILAIN *et al.* 2006; MENDES *et al.* 2015).

A intensidade de uso do solo na região amazônica tem provocado a substituição da cobertura vegetal nativa por áreas de pastagem e agricultura, sendo o corte e a queima as principais atividades praticadas que induzem a mudanças nos ciclos biogeoquímicos (Cenciani 2009; Rodrigues *et al.* 2013; Navarrete *et al.* 2015), as quais podem levar o ambiente a um stress ambiental acarretando desequilíbrio microecológico no solo.

O construto da hipótese está pautado na influência do processo de desmatamento que desencadeia o fator de virulência do *Bacillus cereus* em área de pasto comparado com área de floresta independente do tipo de solo. Segundo Araújo e Monteiro (2007), a atividade microbiana concentra-se na camada mais superficial do solo, entre 1 a 30 cm; nesta camada, os microrganismos ocupam um percentual menor que 0,5 do volume total do solo, o que representa menos que 10% da matéria orgânica.

O solo é um sistema complexo formado por fatores geológico, topográfico e climático que possibilitam grandes variedades de bactérias, fungos e protozoários, os quais são

essenciais para a manutenção de agroecossistemas, uma vez que os microrganismos têm sido cada vez mais associados à qualidade ambiental (Brasil 1978), nos teores dos atributos do solo, interferindo nos processos de interações microbianas.

Considerando o crescente avanço da transformação da floresta em pasto na região Amazônica, o objetivo da pesquisa foi identificar e caracterizar a bactéria *Bacillus cereus* a partir da análise de parâmetros físicos e biológico do solo. Neste sentido, a expansão da pecuária no Estado de Rondônia, pode ter sido um fator potencializador negativo no equilíbrio do ecossistema local.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

Localizada à noroeste do Estado de Rondônia, a bacia hidrográfica do rio São Francisco é um exemplo de recurso hídrico que foi atingida pelos empreendimentos Hidrelétricos de Jirau e Santo Antônio. É uma sub-bacia do rio Jaci-Paraná com aproximadamente, 98% de sua área inserida no município de Porto Velho-RO, totalizando 2.252,77 Km² (Figura 1). Quanto ao uso e cobertura da terra, a vegetação predominante é do tipo Floresta Ombrófila densa, com expressiva atividade econômica no setor da pecuária extensiva, com área de 879,06 km² (NUNES, 2014).

O clima é do tipo Aw, conforme a classificação de Köppen, com registro de temperatura para o mês mais frio superior a 18 °C, apresentando estação seca de pequena duração e elevada precipitação. As médias anuais dos índices pluviométricos apresentam variações de 1.800 à 2.100 mm aa⁻¹, assegurando chuvas intensas e concentradas em pequenos períodos (NIMER 1989; RONDÔNIA 2001; RONDÔNIA 2005).

Figura 1 - Mapa de localização da Bacia Hidrográfica do rio São Francisco-RO



Fonte: Os autores

Amostras de solo

A coleta de solo foi realizada em áreas de floresta e pastagem com o Trado Holandês na profundidade de 0-20 cm, conforme metodologia descrita por Faoro (2010). As amostras para as análises de vulnerabilidade natural à erosão foram encaminhadas ao Laboratório de Geografia e Planejamento Ambiental, a extração de DNA e da Reação em Cadeia de Polimerase – PCR no Centro Interdepartamental de Biologia Experimental e Biotecnologia/UNIR, e os testes microbiológicos na FIOCRUZ-RO. Os pontos de coleta, coordenadas geográficas, uso e cobertura da terra e tipo de solo estão listados na Tabela 1. A determinação do tipo de uso da terra foi definida *in loco*.



Tabela 1 - Localização dos pontos de coleta, uso da terra e tipo de solo da bacia do rio São Francisco-BSF.

Pontos de Coleta	Latitude	Longitude	Uso da terra	Tipo de solo
BSF 01	64° 35' 31.6'' W	9° 31' 48.6'' S	Pastagem	Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico-LVAd
BSF02	64° 35' 29.6'' W	9° 32' 5'' S	Floresta	Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico-LVAd
BSF 03	64° 31' 8.5'' W	9° 25' 19.8'' S	Pastagem	Neossolo Litólico Distrófico-Rybd
BSF 04	64° 31' 18.4'' W	9° 25' 21.2'' S	Floresta	Neossolo Litólico Distrófico-Rybd
BSF 05	64° 28' 12.8'' W	9° 42' 5.2'' S	Floresta	Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico-LVAd
BSF06	64° 28' 13.9'' W	9° 42' 8.6'' S	Pastagem	Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico-LVAd
BSF 07	64° 42' 27.5'' W	9° 26' 3.7'' S	Pastagem	Argissolo Vermelho Amarelo Distrófico PVAd
BSF 08	64° 42' 29.7'' W	9° 26' 11.2'' S	Floresta	Argissolo Vermelho Amarelo Distrófico PVAd
BSF 09	64° 39' 17.9'' W	9° 29' 18.5'' S	Floresta	Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico-LVAd
BSF 10	64° 35' 22'' W	9° 28' 28.5'' S	Pastagem	Neossolo Litólico Distrófico-Rybd

Fonte: Adaptado de PLANAFLORO (2001).

Macro e Micronutrientes do solo

Os atributos do solo foram analisados pelo Laboratório de Análises de Solo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/RO) que determinou pH, matéria orgânica (MO), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), acidez potencial (H+Al), Alumínio (Al), capacidade de troca catiônica (CTC), saturação por alumínio (m), saturação por base (v), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn). Os valores de pH foram realizados em água 1:2,5 e a matéria orgânica por digestão úmida. O fósforo e o potássio foram determinados pelo método Mehlich-1 e o Ca, Mg e Al trocáveis foram extraídos com KCl 1 mol L⁻¹.

Teor de umidade do solo

O teor de umidade do solo foi determinado a partir do protocolo descrito pela EMBRAPA (1997), que consistiu em pesar 50g de solo úmido e, em seguida secá-lo em estufa a 105 °C por 24 horas. Após secagem, a amostra foi novamente pesada para a realização do cálculo de umidade.

*Isolamento e identificação do *Bacillus cereus**

O isolamento da bactéria *B. cereus* seguiu a metodologia descrita pela World Organization (1985). Segundo Mossel *et al.* (1967), Raimundo e Robbs (1988), Wong *et al.* (1988), Stadhouders (1992), Van Netten e Kramer (1992) e Giffel *et al.* (1995).

*Bioquímica do *B. cereus**



Para confirmar as colônias isoladas com características do *B. cereus* foram realizados os seguintes testes bioquímicos: fermentação da lactose, glicose, produção de gás, produção de H₂S, descarboxilação de ornitina e arginina, produção de urease, indol, motilidade e crescimento rizoide, conforme descritos por RAJKOWSKI e BENNETT (2003) e MURREY *et al.* (2008).

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir do cultivo de células, que foram isoladas do solo pelo método Fenol Clorofórmio Álcool-isoamílico, seguindo o protocolo descrito por SAMBROOK *et al.* (1989). Para a quantificação em ng μl^{-1} do DNA extraído das amostras isoladas utilizou-se o aparelho NanoDrop 1000 *Spectrophotometer* da Thermo Scientific.

Identificação de *Bacillus cereus* a partir de amplificação do gene *NHE*

A identificação da presença e/ou ausência do gene tripartido *NHE* nos isolados de *Bacillus cereus* foi detectado por Reação em Cadeia de Polimerase – PCR utilizando Master Mix/PCR (Tampão de reação 10x (100 mM de Tris-HCl, pH 8,5 e 500 mM KCl, 1,7 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs e 1,5 U de Taq DNA Polimerase), primer 200 nM de cada oligos, DNA e água Milliq. As condições de amplificação do gene *nheABC* foram: ciclo inicial de 10 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 3 segundos a 96 °C, anelamento de 3 segundos a 58 °C, extensão de 15 segundos a 68 °C e extensão final de 10 segundos a 72 °C. Foram utilizados os seguintes primers: *nheA* 5'GTTAGGATCACAATCACCGC3', 3'ACGAATGTAATTTGAGTCGC5'; *nheB* TTTAGTAGTGGATCTGTACGC, 3'TTAATGTTCGTTAATCCTG5'; *nheC* 5'TGGATTCCAAGATGTAACG3', 3'ATTACGACTTCTGCTTGTGC5', conforme descrito por Guinebretiére *et al.* (2002). Após realizada a PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% para visualização dos fragmentos amplificados da região de interesse.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os atributos químicos do solo, em diferentes tipologias da bacia do rio São Francisco (BSF) revelaram variações em áreas de floresta e pastagem. As amostras BSF 01, BSF 02, BSF 05, BSF 06 e BSF 09 caracterizaram-se como Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico-



LVAd. Segundo Lopes e Guilherme (2004), apesar da alta percentagem de argila, o Latossolo se comporta quimicamente de modo similar ao solo arenoso por apresentar baixa atividade de caulinita, sesquióxidos de ferro e alumínio. As amostras BSF 03, BSF 04 e BSF 10 foram classificadas como Neossolo Litólico Distrófico-RLd, apresentaram baixa intensidade pedogenética cuja constituição tem sua gênese em processos mineralógicos.

Os Neossolos Litólicos são rasos e ocorrem em área mais elevada, MORATO DE CARVALHO e RIBEIRO ZUCHI (2009). As amostras BSF 07 e BSF 08 foram caracterizadas como Argissolo Vermelho Amarelo Distrófico-PVAd que compreendem solos com minerais não hidromórficos e argila de baixa ou alta atividade. Após análise laboratorial de micro e macro nutrientes os dados foram submetidos à estatística experimental e descritiva (Tabela 2).

O potencial hidrogeniônico (pH) do solo permaneceu ácido nos dois ecossistemas, variando de 4,6 a 4,7, resultado peculiar de solos da região da Amazônica Tropical. Os grandes teores de acidez em áreas de floresta corroboraram com Neill *et al.* (2006) e Cenciani (2009) identificaram que a troca catiônica K^+ , Ca^+ e Mg^{2+} desencadeiam o aumento teor do pH.

A média de saturação de alumínio (m) é maior em área de pasto em detrimento da floresta, e o ferro (Fe) apresenta teor médio superior em pasto quando comparamos com a floresta. Os Latossolos brasileiros apresentam óxido de ferro bastante comum na Amazônia, cuja coloração é sobretudo avermelhada, por sua vez o fósforo está presente nos dois ecossistemas de forma similar, indicando certo equilíbrio nos processos de solubilização e mineralização realizados por bactérias, fungos e actinomicetos, os quais, segundo Silva Filho e Vidor (2000) não são potencializados na presença de ferro, cálcio, nitrogênio e carbono.

A média do atributo manganês (Mn) em área de floresta apresentou-se maior quando comparado com área de pastagem, isso pode estar relacionado à baixa ausência de bactérias do gênero *Pedomicrobium*, cuja função é realizar oxi-redução (MOREIRA 2013). Os demais atributos, como matéria orgânica (MO), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), não apresentaram alterações significativas do esperado.

De modo geral, os resultados da mediana demonstraram proximidade entre os dois ecossistemas no que se refere à uniformidade e à espacialização, somente ocorrendo diferenciação nos atributos Fe e Mn – estes observados no momento das análises. Todos os

elementos químicos são essenciais para o meio ambiente, mas as altas concentrações podem afetar a produtividade ecossistêmica, afetando a sustentabilidade microecológica do solo.

Tabela 2 – Análise físico-químicas de micro e macro nutrientes em área de pastagem e floresta da bacia do rio São Francisco-RO.

Profundidade 0-20 m															
Área de Pastagem	pH	MO	P	K	Ca	Mg	H+A	Al	CTC	M	V	Cu	Fe	Mn	Zn
	Água	g kg ⁻¹	mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³						- % -		mg/ dm ⁻³			
Media	4,5	12,5	6	0,1	0,4	0,23	7,7	1,5	7,06	70,2	9,6	0,2	305,9	9,0	0,9
Mediana	4,8	12,4	5	0,1	0,2	0,13	7,7	1,3	6,7	78,0	7	0,2	400,1	3,0	0,9
Desvio Padrão				0,0											0,3
Variância	0,3	2,3	1,8	5	0,4	0,07	2,6	0,6	1,8	19,4	7,7	0,3	233,2	14,3	
	0,1	5,4	3,5	0,0	0,2	0,06	6,7	0	3,3	377,7	59,8	0,09	54404,6	205	0,1
Coeficiente de variação %				56,1	117,1	32,08		40,5	25,9						34,5
	8,2	18,4	31,1							27,6	80,5	102,4	76,2	158,5	5
Profundidade 0-0,20 m															
Área de Floresta	pH	MO	P	K	Ca	Mg	H+A	Al	CTC	M	V	Cu	Fe	Mn	Zn
	Água	g kg ⁻¹	mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³						- % -		mg/ dm ⁻³			
Media	4,7	33,7	6,6	0,1	1,6	0,49	7,54	1,6	12,3	49,4	24,2	1,1	175,1	55,9	1,4
Mediana	4,2	12,4	5	0,1	0,1	0,13	6,9	1,3	9,7	67,0	12	0,7	139,9	15,3	1,4
Desvio Padrão				0,0						40,0	26,8				0,5
Variância	0,8	24,3	4,6	2	2,09	0,27	3,2	1,2	5,2	4	9	1,2	165,6	63,6	
	0,7	589,5	21,3	0,0	4,4	0,07	6	1,6	27,5	1603,	723,2	1,6	27435,8	4045,8	0,3
Coeficiente de variação %															
		72,0		15,3	129,1			78,5	42,6	81,0	111,5	110,6	94,5	113,7	38,9
	18,5	4	69,9	3	1	56,4	43,7	5		5	1	6			

Fonte: Os autores.

O desvio padrão dos atributos do solo em áreas de pastagem e de floresta apresentou-se de forma distinta nos dois ecossistemas, indicando uma variabilidade e um comportamento

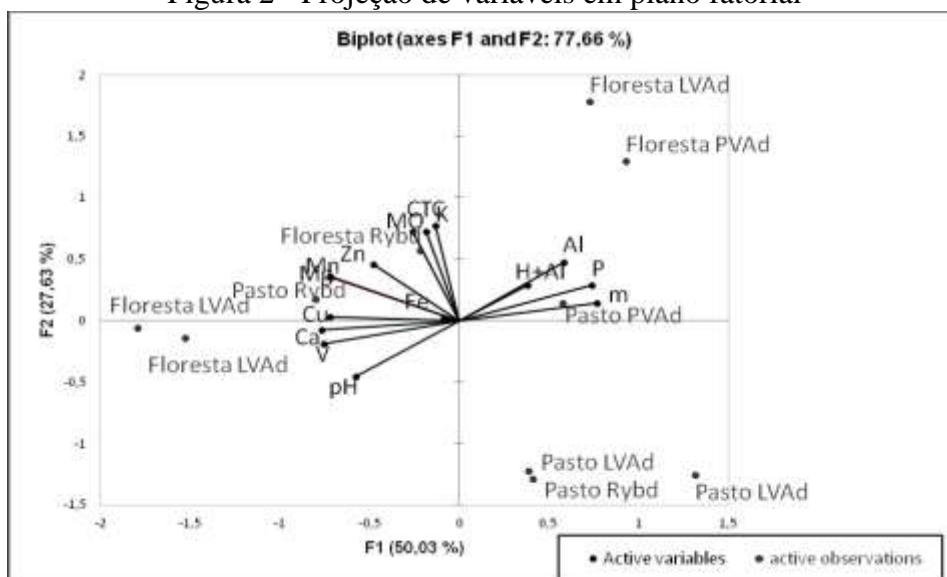


singular entre os dois sistemas, principalmente na floresta, cujo desvio padrão foi maior nos atributos de saturação de alumínio (M), ferro (Fe) e manganês (Mn) quando em comparação com área de pasto, o que indica condições favoráveis para a manutenção das atividades microbiológicas na produção de matéria orgânica. Na pastagem, o desvio padrão foi menor quando comparado com a floresta na saturação por base (V) e na matéria orgânica (MO), observando-se que o ecossistema não recebe aporte nutricional adequado para suprir a necessidade orgânica. As condições ambientais do pasto possivelmente estão contribuindo para esse baixo valor de V e MO. Em área de floresta, em detrimento da pastagem, a média da MO foi de 33,7% e desvio padrão 24,3, mostrando uma dispersão significativa entre pasto e floresta, que pode estar associado ao desmatamento, processos erosivos, e ao manejo inadequado do solo provocando desequilíbrio microecológico.

Os dados de floresta e de pastagem foram plotados no Software XLStart 2017 para a Análise dos Componentes Principais – PCA, considerando os atributos do solo, a tipologia e o uso e cobertura da terra. A direção dos vetores indicou o aumento dos atributos nos diferentes ecossistemas estudados. No quadrante superior direito (Figura 2), a distribuição dos atributos Al e H+Al foi de alto teor, mostrando grande acidez do solo de pastagem tipo Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico-LVAd. Entre os atributos investigados, o ferro apresentou, em média, maior contribuição em área de pastagem em detrimento da floresta. O ferro tem um papel importante, pois está associado ao funcionamento das enzimas citocromo, catalase e succinil desidrogenase. Já o fósforo, cuja representação foi comum em ambos os ecossistemas, participa de forma peculiar na síntese de ácidos nucleicos e ATP, sendo assim fundamental para o *Bacillus cereus*.

O menor teor de matéria orgânica em solo de pasto pode ser explicado pelo recente processo de substituição da floresta. Os maiores teores de P e Al são característicos de Neossolo por apresentar elevado potencial de acidez. Todas as amostras de solo em área de floresta e de pasto foram caracterizadas com pH ácido propício de região tropical, altamente intemperizados, cujo principal caráter químico é a baixa de CTC (CONCEIÇÃO *et al.* 2005, JESUS *et al.* 2009). A contribuição do elemento ferro em área de pasto corrobora os dados de Jesus *et al.* (2009) como característico de Latossolo. Observou-se, ainda, uma forte correlação dos atributos Zn, Ca, Mg, Mn e Cu em área de floresta em detrimento do pasto.

Figura 2 - Projeção de variáveis em plano fatorial



Fonte: Os autores.

A média de teor de umidade nas amostras em área de pastagens foi de 9,92%, já nas amostras de floresta a média de teor de umidade foi de 20,24%. A compactação do solo, o pisoteio do gado e a alta incidência da luz solar pode estar deixando o solo com pouca umidade (Nunes, 2014). A substituição da floresta por pasto induz a alterações químicas, físicas e biológicas no solo, acarretando variações de pH e de teores de micro e macro nutrientes. Os dados obtidos neste trabalho para o teor de umidade de solo confirmam a influência da manutenção da matéria orgânica proveniente da decomposição de restos de animais e vegetais.

Após caracterização química e física do solo, determinou-se a presença do *Bacillus cereus* nas amostras a partir das técnicas clássicas da microbiologia e modernas da biologia molecular. Os esporos de *Bacillus cereus* podem ser encontrados no solo desenvolvendo-se em alguns insetos terrestres, como filamentos de *Arthromitus* (Margulis *et al.* 1998; Jensen *et al.* 2003) e na rizosfera (Halverson *et al.* 1993; Saile e Koehler 2006).

Das 10 amostras analisadas, 100% foram positivas para a presença de *Bacillus cereus* em solo de floresta e pasto. Investigando o gene tripartido do *B. cereus*, o gene *nheA* foi encontrado em 80% das amostras de pasto e em 60% das amostras de floresta, enquanto o gene *nheB* foi encontrado em 40% das amostras de pasto e nenhuma nas de floresta, o gene *nheC* foi encontrado em 40% das amostras de floresta e em 20% nas amostras de pasto. Neste



contexto, o gênero *Bacillus*, onde se encontra agrupado, a espécie *Bacillus cereus*, apresenta maior correlação nas áreas de pastagem em detrimento de floresta (MENDES *et al.* 2015). Observou-se que o solo, em condições favoráveis de teor de umidade, matéria orgânica, pH, temperatura e nutrientes, constitui-se um reservatório natural para o *Bacillus cereus*.

A mesma tipologia de solo pode não ser fator determinante para indicar a presença do *Bacillus cereus* com relação ao gene *nheB* que foi identificado em área de pasto e não houve ocorrência nas áreas de floresta. A presença do gene *nheB* na área de pasto pode ser atribuído a fatores e condições ambientais, assim como pelos processos evolutivos.

Quanto ao *nheC*, Lindbäck *et al.* (2004) afirma que com o aumento da concentração do componente ocorre o decréscimo da atividade citotóxica que inibe a ação do *nheB*, sendo este o componente responsável pela ligação das células alvo, pois estas mudanças podem estar relacionadas às ações antrópicas no ambiente. Consoante com as pesquisas de Ehling-Schulz *et al.* (2006), dentre as estirpes de *Bacillus cereus*, o gene tripartido que codifica três proteínas NHE, denominados *nheA*, *nheB* e *nheC*, codifica enterotoxina não hemolítica, a qual constitui maior evidência de produção de toxinas. O gene, portanto, está presente em cerca de 100% dos isolados bacterianos (SOARES 2008).

A região *nheA* foi identificada com maior frequência em detrimento das regiões *nheB* e *nheC*, na área de pasto. Em pesquisa desenvolvida por Hansen *et al.* (2001), pelo menos dois dos três genes do NHE faltavam nas amostras dos *Bacillus cereus*, enquanto que em outras cepas faltavam os três genes. Além da presença dos três componentes do gene *NHE*, o fator de transcrição *plcR*, localizado antes do gene *nheA*, e importante para expressar a toxina.

A caracterização bioquímica dos isolados de *Bacillus cereus* apresentou-se de forma variada: apenas uma amostra teve resultado positivo para a produção de lactose; duas cepas foram capazes de produzir uréase; dois isolados tiveram resultados negativos para a utilização de glicose; e cinco isolados foram negativos para motilidade. Foram também negativos para sulfeto de hidrogênio (H₂S), produção de gás na presença de carboidratos e atividade de ornitina (Tabela 3). O *Bacillus cereus* apresentou colônias esbranquiçadas, não fermentadoras de manitol, com aspecto rugoso e seco, medindo entre três e seis milímetros de diâmetro, com a presença de halo esbranquiçado devido a ação da lecitinase (Figura. 3). A partir dos testes bioquímicos os resultados indicaram que a bactéria está em plena atividade funcional em área

de floresta e pasto, qualquer alteração ambiental poderá causar transformação no ecossistema provocando mudanças nos aspectos físico-químico do solo.

Tabela 3 – Testes bioquímicos de isolados bacterianos para seleção do gênero *Bacillus*

AMOSTRA	LAC	GLI	GÁS	H ₂ S	ORN	ARG	URE	IND	MOB	CRESC RIZ.
BSF 01	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BSF 02	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BSF 03	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
BSF 04	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
BSF 05	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
BSF 06	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
BSF 07	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
BSF 08	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BSF 09	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-

Legenda: LAC-Lactose; GLI-Glicose; GÁS- Produção de gás na presença de carboidrato; H₂S-Sulfeto de hidrogênio; ORN-Ornitina; ARG-Arginina, URE- Ureia; IND- produção de Indol; MOB-Motilidade; CRESC RIZ- Crescimento rizoide.

Fonte: Os autores

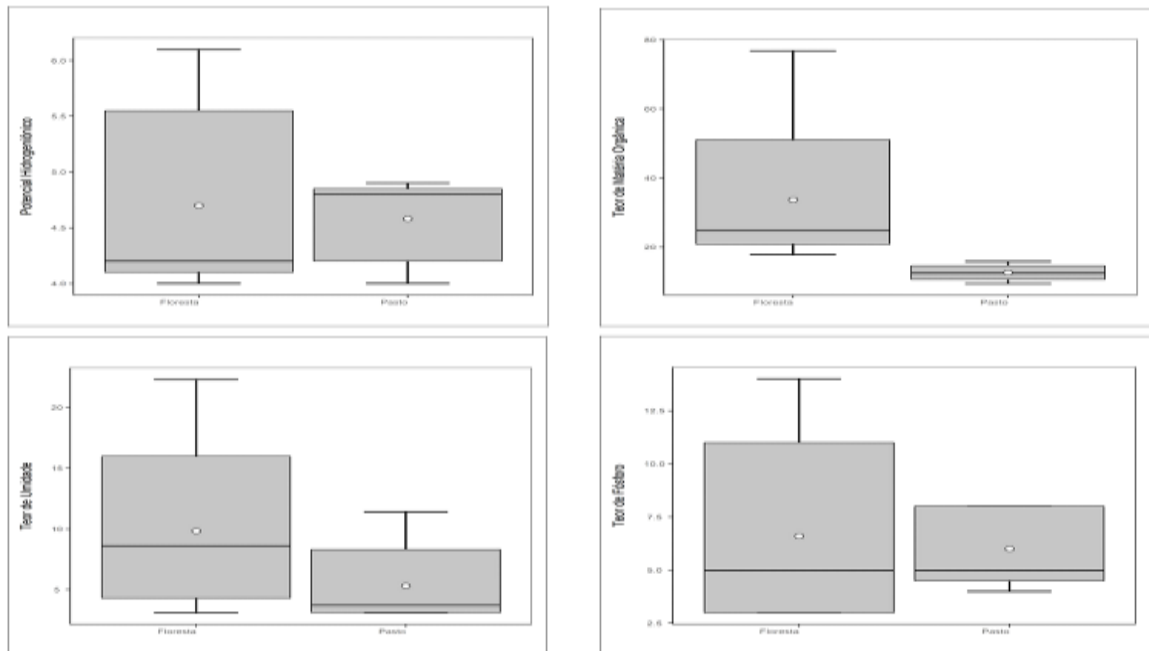
Figura 3 - Cultura de *Bacillus cereus* em meio MYP



Fonte: Os autores

Para verificar a relação entre os parâmetros físico-químico do solo e a incidência do *Bacillus cereus* foi utilizado o método estatístico Boxplot (Figura 4) para demonstrar a distribuição de variáveis físico-químicas do solo em área de floresta e pasto. O valor da mediana do potencial hidrogeniônico, teor de matéria orgânica, teor de umidade, e teor de fósforo foram considerados significativamente variáveis entre os dois ecossistemas. Não há *outlier* no conjunto dos dados apresentados indicando que não há discrepância na representação das informações dos parâmetros químicos.

Figura 4 – Representação por “box-plot” as variações dos parâmetros avaliados em ecossistemas de floresta e pasto de amostragem situadas na bacia do rio São Francisco/RO. Software Action Atat 3.3.2 /2018.



Fonte: Os autores

A concentração mais elevada de fósforo foi encontrada em área de floresta indicando equilíbrio microecológico desempenhado por organismos solubilizadores de fosfatos, os quais proporcionam melhor crescimento vegetativo e consequentemente a produção de biomassa. De modo geral, o pH e o teor de umidade correlacionaram positivamente com a presença do *Bacillus cereus* em área de floresta. As variáveis quando em desequilíbrio podem causar alterações físico-químicas, interferindo no processo de ciclagem dos nutrientes, e consequentemente na vida de micro-organismos presente no solo.

Na área de pastagem a densidade da matéria orgânica apresentou valores simétrico em relação a área de floresta, demonstrando baixa quantidade desse elemento. As variáveis pH, teor de umidade e fósforo foram significativamente diferentes para cada parâmetro quando comparados no ambiente de pasto e floresta. A concentração do potencial hidrogeniônico em área de floresta está representada entre o 1º e 3º quartil demonstrando o agrupamento do teor de acidez. Segundo Melloni, (2007) o estresse biológico causado pela mudança de parâmetros físico-químicos afetam direta ou indiretamente a microbiota do solo.

As distribuições das variáveis foram assimétricas nas áreas de floresta e pasto com exceção do teor de matérias orgânica que apresentou-se de foram simétrica para a área de

pastagem. Os resultados corroboram com a hipótese da influência sobre o processo de desmatamento que desencadeia o fator de virulência do *Bacillus cereus* em área de pasto comparado com área de floresta, independente do tipo de solo, quanto à presença do gene tripartido do *Bacillus cereus*.

Para tanto as variações dos elementos abióticos potencializam estresse ambiental em decorrência de atividade antrópica. Segundo Fortes Neto, Fernandes e Jahnel (2007) atividade microbiana no que se refere à presença do *Bacillus cereus* na floresta e no pasto qualifica o solo, assim como os resultados constatados nesta pesquisa. Os resultados bioquímicos do *Bacillus cereus* demonstram que a bactéria está em plena atividade microbiológica no ecossistema abrindo perspectiva para investigação de patologia no gado, a exemplo da mastite. Por fim, a sustentabilidade ambiental pode ser uma alternativa para a manutenção da atividade microbiana evitando a proliferação de organismos fitopatogênicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As amostras de solo analisadas indicaram a presença do *Bacillus cereus* em diferentes condições ambientais como teor de umidade, tipo de solo, matéria orgânica, pH e temperatura, proporcionando boas condições de desenvolvimento bacteriano. A presença do gene *NHE*, codificante da enterotoxina não-hemolítica, em amostra de floresta apresentou, ao menos, um dos genes, sendo aqueles potencialmente positivos para o desencadeamento de patogenicidade. Tal assertiva indicou a presença do *Bacillus cereus* em todas as amostras de solo, independente da tipologia e dos atributos encontrados.
- Conclui-se que a análise molecular do gene *NHE*, codificante da enterotoxina não-hemolítica foram positivos para área de pasto e floresta, sendo assim, estes isolados são potencialmente patogênico já que apresentaram ao menos um dos genes que compõem o gene tripartido *NHE*, podendo levar patogenicidade quando associado ao desequilíbrio dos parâmetro abióticos. O estresse ocasionado pela perturbação antrópica eventualmente potencializará a competição por nutrientes do solo, e a proliferação de microrganismos oportunistas.

Agradecimentos



Ao Laboratório de Geografia e Planejamento Ambiental – LABOGEOPA/UNIR pelo apoio logístico na coleta das amostras de solo. Ao Prof. Dr. Michel Watanabe pelo apoio no desenho cartográfico. A Fundação de Amparo ao Desenvolvimento das Ações Científicas e Tecnológicas e à Pesquisa do Estado de Rondônia – FAPERÓ. A FIOCRUZ/RO, CNPq FINEP e CAPES pelo apoio financeiro e instrumental.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A.S.F; MONTEIRO, R.T.R.. Indicadores biológicos de qualidade do solo. In. **Revista Bioscience Journal**, 23: 66-75. 2007.
- BRASIL.. Departamento Nacional de Pesquisa Mineral. **Projeto RADAMBRASIL**. Folha SC 20 Porto Velho: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro. 1978.
- CENCIANI, K.; LAMBAIS, M.R.; CERRI, C.C.; BASÍLIO DE AZEVEDO, L.C.; FEIGL, B.J.. Bacteria diversity and microbial biomass in forest, pasture and fallow in the southwestern Amazon basin. In. **Revista Brasileira Ciência Solo**, 33: 907-916. 2009.
- CONCEIÇÃO, P.C.; AMADO, T.J.C.; MIELNICZUK, J.; SPAGNOLLO, E. Qualidade do solo em sistemas de manejo avaliada pela dinâmica da matéria orgânica e atributos relacionados. In. **Revista Brasileira de Ciência Solo**, 29: 777-788. 2005.
- EHLING-SCHULZ, M.; GUINEBRETIERE, M. H.; MONTHAN, A.; BERGE, O.; FRICKER, M.; SVENSSON, B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. In. **FEMS Microbiology Lett.**, 260: 232-240. 2006.
- EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. *Manual de métodos de análises de solo*. Centro Nacional de Levantamento e Conservação do Solo. Embrapa Solos, Rio de Janeiro, p 212. 1997.
- FAORO, H.. *Prospecção metagenômica de biocatalisadores da microbiota de solos da floresta atlântica paranaense*. 2010. 214 f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica/Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- GIFFEL, M.C.; BEUMER, R.R.; SLAGHUIS, B.A.; ROMBOUST, F.M. Occurrence and characterization of (psychotropic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. In. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, 213: 125-138. 1996.



- GUINEBRETIERE, M. H.; BROUSOLLE, V.; NGUYEN-THE, C. Enterotoxigenic profiles of foodpoisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. In. **Applied Environmental Microbiology**, 40: 3053-3056. 2002.
- HALVERSON, L.J.; CLAYTON, M.K.; HANDELSMAN, J. Population biology of *Bacillus cereus* UW85 in the rhizosphere of field-grown soybeans. In. **Soil Biology Biochemistry**, 25: 485-493. 1993.
- HANSEN, B.M.; HENDRIKSEN, N.B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. In. **Applied Environmental Microbiology**, 67: 185-189. 2001.
- JENSEN, G.B.; HANSEN, B.M.; EILENBERG, J.; MAHILLON, J. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. In. **Environmental Microbiology**, 5: 631-640. 2003.
- JESUS, E.C.; MARSH, T.L.; TIEDJE, J.M.; MOREIRA, F.M. Changes in land use alters the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. In. **The ISME Journal**, 3: 1004-1011. 2009.
- LINDBECK, T.; FAGERLUND, A.; RØDLAND, M.S.; GRANUM, P.E. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. In. **Microbiology**, 150: 3959-3967. 2004.
- LOPES, A.S., GUILHERME, L.R.G. 2004. **Interpretação de análise de solo conceitos e aplicações**. Boletim Técnico. Associação Nacional para Difusão de Adubos-ANANDA. Disponível em: < www.portal.ufra.edu.br/attachments/641_Boletim_02.pdf>. Acesso em: 31 jul. 2017.
- MARGULIS, L.; JORGENSEN, J.Z.; DOLAN, S.; KOLCHINSKY, R.; RAINEY. The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: intestinal symbionts of animals. In. **PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, 95: 1236-1241. 1998.
- MENDES, L.W.; BROSSI, M.J.L.; KURAMAE, E.E.; TSAI, S.M. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. In. **Applied Soil Ecology**, 90: 151-160. 2015.
- MORATO DE CARVALHO, T.; RIBEIRO ZUCHI, M. Morfometria e caracterização do meio físico de ambientes lacustres no vão do Paranã-Goiás, Brasil. Uma primeira aproximação. **Terra Nueva Etapa**, Vol. XXV, No. 38, 2009, pp 111-139. Disponível em: <



<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=72112047006>>. Acesso em: 31 nov. 2017.

MOREIRA, W.M.Q. *Estudo da diversidade e atividade bacteriana em solos de floresta e sob cultivo de cana-de-açúcar*. 2013. 103 f. Tese (Doutorado Ciências Agrárias e Veterinárias), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

MOSSEL, D.A.A.; KOOPMAN, M.J.; JONGERIUS, E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. In. **Applied Microbiology**, 15: 650-653. 1967.

MURREY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. Manual of clinical microbiology. In. **ASM Press**, 1(9). 2008.

NAVARRETE, A.A.; TSAI, S.M.; MENDES, L.W.; FAUST, K.; DE HOLLANDER, M.; CASSMAN, N.A.; RAES, J.; VAN VEEN, J.A.; KURAMAE, E.E. Soil microbiome responses to the short-term effects of Amazonian de forestation. In. **Molecular Ecology**, 24: 2433-48. 2015.

NEILL, C.; PICCOLO, M.C.; CERRI, C.C.; STEUDLER, P.A.; MELILLO, J.M. Soil solution nitrogen losses during clearing of lowland Amazon forest for pasture. In. **Plant Soil**, 281: 233-245. 2006.

NIMER, E. *Climatologia do Brasil*. 2. ed. IBGE/Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Rio de Janeiro, 1989. 427p.

NUNES, D.D. *Análise da vulnerabilidade à erosão em bacia hidrográfica na Amazônia sul ocidental: estudo de caso na bacia do rio São Francisco – Rondônia*. Relatório de pesquisa científica, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia. 79p. 2014.

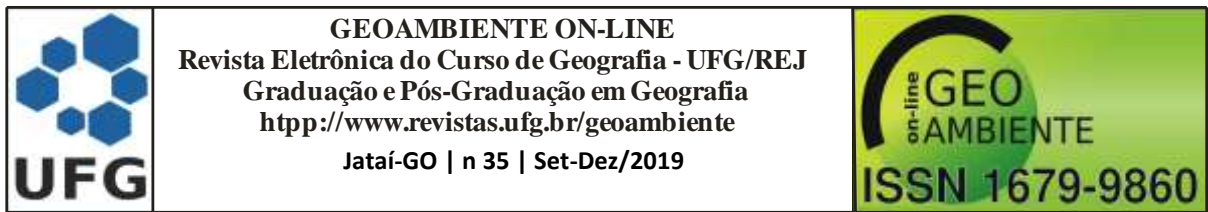
RAIMUNDO, S.M.C.; ROBBS, P.G. *Pesquisa de Staphylococcus aureus, Bacillus cereus e Salmonella sp em alguns produtos de laticínios comercializados na cidade do Rio de Janeiro*. Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 11: 69-76. 1988.

RAJKOWSKI, K.T.; BENNETT, R.W. BACILLUS CEREUS. In: MILIOTIS, M.D.; BIER, J.W. (Ed.). In. **Intenational Handbook of Foodborn Pathogens**. 1. ed. Maecel Dekker, Inc., New York, p. 809. 2003.

RONDÔNIA. Plano Agroflorestal de Rondônia – PLANAFLORO. *Relatório Técnico. Tecnossolos*, Porto Velho, Rondônia. 2001.



- RODRIGUES, J.L.M.; PELLIZARI, V.H.; MUELLER, R.; BAEK, K.; JESUS, E.C.; PAULA, F.S. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. In. **PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, 110: 3988-3993. 2013.
- RONDÔNIA. *Boletim Climatológico de Rondônia, ano de 2003*. Secretaria de Estado do Desenvolvimento Ambiental (SEDAM), Porto Velho, Rondônia. 2005.
- SAILE, E.; KOEHLER, T.M. Bacillus anthracis multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants. In. **Applied Environmental Microbiology**, 72: 3168-3174. 2006.
- SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989., New York, 720p.
- SANTOS, C.A. *Ocorrência e Diversidade de Fatores de Virulência em Isolados Brasileiros de Bacillus cereus Provenientes de Alimentos e do Solo*. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.
- SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fonte de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 24: 311-319. 2000.
- SILVEIRA, A P. D.; FREITAS, SUELI S. *Microbiota do solo e qualidade ambiental*. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. 312 p.: il.
- SOARES, C. M.; VALADARES, G.F; AZEREDO, R.M.C.; KUAYE, A.Y. Contaminação ambiental e perfil toxigênico de *Bacillus cereus* isolados em serviços de alimentação. Santa Maria. In. **Ciência Rural**, 38: 504-510. 2008.
- STADHOUDERS, J. Taxonomy of Bacillus cereus. **Bulletin of International Dairy Federation**, 275: 4-8. 1992.
- VAN NETTEN, P.; KRAMER, J.M.. Media for the detection and enumeration of Bacillus cereus in foods: a review. In. **International Journal of Food Microbiology**, 17: 85-99. 1992.
- VILAIN, S.; LUO, Y.; HILDRETH, M.B.; BROZEL, V.S. Analysis of the life cycle of the soil saprophyte Bacillus cereus in liquid soil extract and in soil. In. **Applied Environmental Microbiology**, 72: 4970-4977. 2006.
- WONG, H.C.; CHANG, M.H.; FAN, J.Y. Incidence and characterization of Bacillus cereus isolates contaminating dairy products. In. **Applied and Environmental Microbiology**, 54: 699-702. 1988.



WORLD ORGANIZATION. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as microbial larvicide. UNDP/World Bank/WHO **Special programmer of research and training in tropical diseases**, Geneva, 24p. 1985.