

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

LARISSA BORTOLI DE SOUZA

**Identificação e caracterização do gene *nifH* em bactérias isoladas  
do solo de cangas na região de Corumbá, Mato Grosso do Sul**

Campo Grande

2025

LARISSA BORTOLI DE SOUZA

**Identificação e caracterização do gene *nifH* em bactérias isoladas do solo de cangas na região de Corumbá, Mato Grosso do Sul**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção de título de Bacharel em Ciências Biológicas pelo Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS.

Orientadora: Profa. Dra. Gecele Matos Paggi

Campo Grande

2025

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço de coração à minha orientadora, Dra. Gecele Matos Paggi, por todos esses anos de aprendizado, incentivo e por me proporcionar a oportunidade de trabalhar ao lado de uma mulher extraordinária.

Sou grata também aos colegas e amigos que fiz ao longo da graduação, que tornaram essa caminhada mais leve, divertida e cheia de boas memórias.

Um agradecimento mais que especial pra todo o pessoal do LEBio, que sempre foi um cantinho de acolhimento, troca de conhecimento, muitas risadas e quase uma segunda família.

Agradeço profundamente à minha família, especialmente à minha mãe e à minha madrinha, por serem meu alicerce constante, e ao Daniel, por sempre acreditar no meu potencial e me apoiar em cada passo dessa jornada.

## Resumo

O uso excessivo de insumos e fertilizantes artificiais na agricultura tem contribuído para a degradação ambiental, com impactos no solo e na microbiota, alterando suas propriedades físicas, químicas e biológicas. No Brasil, um dos maiores produtores agrícolas do mundo, o consumo de pesticidas e biocidas está aumentando, o que agrava esses efeitos, em alguns casos tornando o solo improdutivo. Dentre os componentes mais importantes do solo está o nitrogênio, elemento essencial à vida, é fixado por microrganismos, especialmente bactérias, que convertem o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em formas assimiláveis pelas plantas. O processo de fixação de nitrogênio é mediado pela enzima nitrogenase, sintetizada a partir do gene *nifH*, o qual é amplamente utilizado como marcador molecular para estudos ecológicos de fixação biológica de nitrogênio. As cangas são um tipo de formação rochosa ferruginosa com relevância ecológica devido às suas condições ambientais extremas, como elevada amplitude térmica, escassez de solo e déficit hídrico. A diversidade bacteriana da rizosfera de bromélias que ocorre nas cangas do Planalto Residual do Urucum inspirou o presente estudo, que busca identificar a presença do gene *nifH* em bactérias isoladas dessa região. Um total de 59 isolados bacterianos foram selecionados, dos quais 21 apresentaram resultado positivo para o gene *nifH*, sendo sequenciados posteriormente. Análises de bioinformática destas sequências foram utilizadas para classificar os isolados taxonomicamente e gerar uma árvore filogenética, com o objetivo de compreender a diversidade e o potencial fixador de nitrogênio dessas bactérias em um ambiente endêmico. Das 21 amostras positivas para o gene *nifH*, foram identificados oito gêneros bacterianos, entre eles: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus*. Esses gêneros são reconhecidos como potenciais fixadores de nitrogênio, destacando-se pelo seu papel promissor na biofertilização e na promoção de práticas agrícolas mais sustentáveis.

**Palavras-chave:** cangas, bioinsumos, *nifH*, isolados bacterianos

## **Abstract**

The excessive use of artificial inputs and fertilizers in agriculture has contributed to environmental degradation, with impacts on the soil and microbiota, altering their physical, chemical and biological properties. In Brazil, one of the largest agricultural producers in the world, the consumption of pesticides and biocides is increasing, which aggravates these effects, in some cases making the soil unproductive. Among the most important components of the soil is nitrogen, an essential element for life, which is fixed by microorganisms, especially bacteria, which convert atmospheric nitrogen (N<sub>2</sub>) into forms that can be assimilated by plants. The nitrogen fixation process is mediated by the nitrogenase enzyme, synthesized from the *nifH* gene, which is widely used as a molecular marker for ecological studies of biological nitrogen fixation. Cangas are a type of ferruginous rock formation with ecological relevance due to their extreme environmental conditions, such as high temperature range, soil scarcity and water deficit. The bacterial diversity of the bromeliad rhizosphere that occurs in the cangas of the Urucum Residual Plateau inspired the present study, which sought to identify the presence of the *nifH* gene in bacteria isolates from this region. A total of 59 bacterial isolates were selected, 21 of which tested positive for the *nifH* gene and were subsequently sequenced. Bioinformatics analyses of these sequences were used to classify the isolates taxonomically and generate a phylogenetic tree, with the aim of understanding the diversity and nitrogen-fixing potential of these bacteria in an endemic environment. Of the 21 samples positive for the *nifH* gene, eight bacterial genera were identified, including: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Paenibacillus* and *Staphylococcus*. These genres are recognised as potential nitrogen fixators, highlighting themselves by their promising role in biopertilization and in the promotion of more sustainable agricultural practices.

**Keywords:** cangas, bioinputs, *nifH*, bacterial isolated

## SUMÁRIO

<b>Introdução.....</b>	<b>6</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>8</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>9</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>11</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>16</b>
<b>Referências.....</b>	<b>17</b>

## Introdução

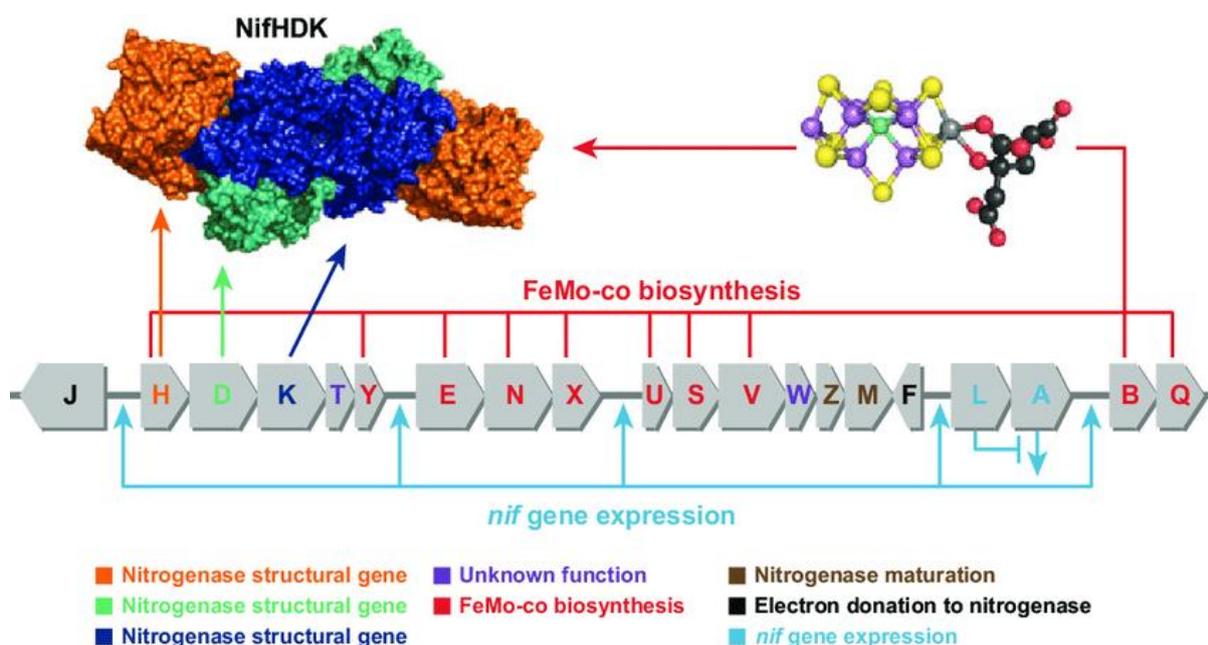
O uso de insumos e fertilizantes artificiais tornou-se indispensável na agricultura em escala industrial devido ao aumento significativo da demanda por alimentos em escala global (DUQUE et al., 2024). Por ser um dos maiores produtores agropecuários e possuir uma extensa área de plantio, o Brasil consome cerca de 8% da produção global de fertilizantes (BRASIL, 2023). Segundo o boletim logístico publicado pela Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), em 2024 os portos brasileiros receberam 44,3 milhões de toneladas de fertilizantes. Cerca de 80% dos adubos sintéticos utilizados no Brasil são importados, tornando o país vulnerável a oscilações de preços desses produtos, afetando diretamente o valor do produto final e a economia do país (BRASIL, 2022). Contudo, essa prática causa impactos diretos no equilíbrio ambiental e na microbiota do solo, modificando suas propriedades físico-químicas e biológicas, causando a degradação estrutural do solo, a escassez de matéria orgânica, alteração de pH e afetando diretamente a microbiota (PAHALVI et al., 2021; DUQUE et al., 2024).

Essas alterações, frequentemente, resultam no empobrecimento do solo e, em alguns casos, tornando-o inutilizável para o cultivo (BLESS; DAVILA; PLANT, 2023). Além disso, o uso excessivo de fertilizantes contribui para a poluição de rios e outros cursos d'água nas proximidades das áreas de cultivo (SAVCI, 2012). Frente ao crescente desafio de aumentar a produção agrícola de maneira sustentável, os bioinsumos, como compostagem, bioestimulantes, biopesticidas e microrganismos para controle de pragas ou como *Rhizobacteria* promotora de crescimento vegetal (MAZID; KHAN, 2015; VIDAL et al., 2018; ANDREATA et al., 2024), despontam como uma alternativa promissora, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental (WANG et al., 2018). Além de oferecerem soluções mais sustentáveis para a agricultura, uso de microrganismo pode otimizar a utilização de nutrientes do solo e reduzir a dependência de fertilizantes químicos (ANDREATA et al., 2024.), e ainda é crucial na restauração ambiental, pois a reconstituição da microbiota do solo pode ser a chave para a recuperação de áreas severamente degradadas (SÁEZ-SANDINO et al., 2023).

O nitrogênio é um dos elementos mais abundantes da Terra (GARCIA et al., 2013) e está presente em moléculas indispensáveis para a vida, como ácidos nucleicos (DNA e RNA), aminoácidos, enzimas e proteínas (OHYAMA, 2010). A fixação de nitrogênio é o processo no qual o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) é reduzido à formas de amônio ( $NH_4^+$ ) ou nitrato ( $NO_3^-$ ) assimiláveis por plantas (HALBLEIB; LUDDEN, 2000). Mais de 60% do  $N_2$  fixado ocorre por meio da fixação biológica de nitrogênio, mediado por microrganismos, como bactérias presentes no solo e água e é catalisado pela enzima nitrogenase, que desempenha um papel

central no ciclo do nitrogênio (POLY; MONROZIER; BALLY, 2001; RUBIO; LUDDEN, 2008 SATAPUTE et al., 2012).

A nitrogenase é composta por dois componentes principais: os núcleos heterodiméricos, que correspondem à dinitrogenase (*nifD* e *nifK*), responsáveis pela redução de  $N_2$ , e a subunidade dinitrogenase redutase (*nifH*) (Fig.1), responsável pela hidrólise de ATP (GABY; BUCKLEY, 2014; RAYMOND et al., 2004; ZEHR et al., 2003). A expressão da nitrogenase é regulada por um conjunto de genes conhecidos como *nif*, dos quais o gene *nifH* se destaca como um marcador molecular amplamente utilizado em estudos ecológicos independentes de cultivo para comprovar o potencial de fixação biológica de nitrogênio (RAYMOND et al., 2004). O gene *nifH* está geralmente localizado no cromossomo bacteriano (KRAUSE et al., 2006) e, por estar presente na maioria dos casos em cópia única funcional, não é considerado um gene de repetição (XIE et al., 2014), o que reforça sua conservação estrutural e funcional. Essa relevância se deve à alta taxa de conservação do *nifH* entre espécies em comparação a outros genes, o que facilita sua aplicação em análises filogenéticas e ecológicas (IZQUIERDO; NÜSSLEIN, 2006).



**Figura 1.** Representação da organização estrutural do grupo de genes *nif* de *Klebsiella pneumoniae*. Os genes *nifD*, *nifH*, e *nifK*, que codificam as subunidades da nitrogenase, estão destacados por cores: *nifD* em verde, *nifH* em laranja e *nifK* em azul. **Fonte:** RUBIO, L. M.; LUDDEN, P. W. *Biosynthesis of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase. Annual Review of Microbiology*, v. 62, n. 1, p. 93–111, 2008

No estudo de Lau et al. (2014), foram realizados levantamentos filogenéticos e filogeográficos com base em sequências de oito genes funcionais comuns entre amostras de solo profundo de diferentes regiões. Desses genes, sete estavam associados à fixação biológica de nitrogênio, incluindo o gene *nifH*, evidenciando essa característica como fundamental para a sobrevivência de microrganismos em ambientes inóspitos. As aplicações do gene *nifH* vão além da identificação funcional, servindo também como uma importante ferramenta taxonômica. Em 2021, Zhang et al. isolou e cultivou cepas associadas a raízes de mandioca afim de analisar a capacidade de fixação desses microrganismos e comparar a atividade nitrogenada entres as diferentes cepas isoladas.

O trabalho de Viana et al. (2020) avaliou a diversidade bacteriana associada à raízes de três espécies de bromélias *Dyckia excelsa*, *Dyckia leptostachya* e *Deuterocohnia meiziana*, que ocorrem em afloramentos rochosos (cangas) no Planalto Residual do Urucum, Corumbá, Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. As cangas são afloramentos rochosos com alta incidência de ferro em sua composição com relevância ecológica devido às suas condições ambientais extremas, como escassez hídrica sazonal, solo ácido e pobre em nutrientes e ampla variação térmica (TAKAHASI; MEIRELLES, 2014; VIANA et al., 2016). Nesse contexto é especialmente relevante considerar a diversidade microbiana presente nos solos dessas áreas, com destaque para as comunidades bacterianas que desempenham papéis essenciais nos ciclos biogeoquímicos e na adaptação aos desafios ambientais extremos, ao mesmo tempo que podem ter potencial para promoção de crescimento vegetal. As comunidades bacterianas foram isoladas e classificadas de acordo com hábito de crescimento da bactéria, endofítica e epifítica (VIANA et al., 2020).

## **Objetivos**

Neste nosso estudo, isolados bacterianos obtidos por Viana et al. (2020) foram utilizados para a realização de um “screening” para a presença do gene *nifH*, com o objetivo de identificar este gene nas bactérias isoladas dessa região. Buscamos compreender como esses microrganismos se relacionam com características ambientais específicas desse ecossistema, como alta incidência de ferro, escassez hídrica, matéria orgânica limitada, fatores que podem influenciar a seleção e o funcionamento de bactérias fixadoras de nitrogênio.

## **Materiais e Métodos**

### **Origem dos isolados bacterianos**

Para o presente estudo foram utilizados 59 isolados oriundos do trabalho de Viana et al. (2020) para identificar a presença do gene *nifH* e, posteriormente, sequenciar os isolados positivos quanto à sua presença. As amostras de DNA foram encaminhadas para o Laboratório de Ecologia e Biologia evolutiva (LEBIO), em Campo Grande/MS, e armazenadas a -4°. Para garantir o sucesso das reações de PCR e padronizar as concentrações das amostras, foram utilizadas apenas as amostras que possuíam concentração igual ou superior a 50 ng/ul.

### **Identificação do gene *nifH***

Para a identificação do gene *nifH* nos isolados bacterianos por PCR, foi utilizado o par de primers PoIR (5'- ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA - 3') e PoIF (5'- TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC - 3'), que amplifica fragmentos de aproximadamente 360 pb (POLY; MONROZIER; BALLY, 2001). As reações de PCR foram realizadas no volume total de 25 µl contendo: 50 ng de DNA, solução tampão 1x, 0,4 mM de dNTP, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada primer e 0,08 U/ul de GoTaq Flexi DNA Polymerase (PROMEGA), e como controle positivo utilizamos uma das cepas que apresentou resultado positivo quanto a amplificação.

As amplificações foram realizadas utilizando o termociclador eppendorf nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos constituído por desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 57 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos para extensão e com extensão final a 72 °C por 5 minutos. Para verificar a ocorrência de amplificação, as 59 amostras analisadas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 2%, coradas com GelRed (Invitrogen) e visualizadas em transluminador de luz UV, e para aquelas amostras que obtiveram resultado positivo foram realizadas triplicatas da reação de PCR para prosseguir com o sequenciamento.

### **Sequenciamento**

As cepas que apresentaram amplificação positiva para o gene *nifH* foram sequenciadas para identificação das espécies e para a análise da filogenia dos grupos de bactérias que possuem o gene. A biblioteca de DNA foi preparada usando o Native Barcoding Kit 96 V14 (SQL-NBD 114.96) de acordo com o manual de instruções do fabricante (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido). A concentração final da biblioteca de DNA foi entre

35-50 fmol. O sequenciamento foi realizado na plataforma MinION MK1B (Nanopore Technology), utilizando a Flow cell FLO-MIN114 (R10.4.1) e as bibliotecas foram sequenciadas por um período de 4 horas.

### **Análises de Bioinformática e identificação taxonômica dos isolados**

Após o sequenciamento, os sinais gerados para a "basecalling" foram analisados e convertidos em arquivos fastq no software minKNOW (versão 24.06.5). Durante a pré-análise, adaptadores e barcodes foram removidos conforme protocolo do Kit Native Barcoding V14 SQK-NBD114.96, usando a ferramenta Porechop v0.2.4. Em seguida, as leituras filtradas foram carregadas na plataforma NanoFilt (Oxford Nanopore Technologies-ONT). Para a filtragem da qualidade das sequências foram utilizados os seguintes parâmetros: min length 200, max length 1200, min coverage de 30% e min identity de 97%.

As leituras foram classificadas taxonomicamente pelo NCBI, utilizando os parâmetros de comprimento 'nifH[All Fields] AND (bacteria[filter] ("900"[SLEN]: "1300"[SLEN]))', resultando em 600 sequências que atenderam aos critérios estabelecidos. O gene *nifH* foi selecionado especificamente para sequências bacterianas com comprimentos de 500 pares de bases. Além das sequências obtidas nas amostras deste estudo, genomas completos de referência contendo o gene *nifH* foram retirados de bancos de dados, como NCBI. O alinhamento das sequências foi realizado pelo software MAFFT, com o parâmetro de penalidade para abertura de gaps (GAP opening penalty) ajustado para 1,53. Primeiramente, as sequências das amostras deste estudo foram alinhadas, seguidas pelas sequências de referência do banco de dados, abrangendo a região-alvo do *nifH*, proporcionando consistência de cada conjunto antes da análise conjunta. Após o alinhamento, foi realizada a extração da região de interesse, correspondente ao fragmento do gene utilizado na construção filogenética. O conjunto final de sequências alinhadas foi então utilizado para a construção de um banco de dados de referência taxonômica, desenvolvido com a ferramenta CRABS (JEUNEN et al., 2023).

### **Análises Filogenéticas**

Com base nos isolados bacterianos classificados, foi realizada a construção de uma árvore filogenética utilizando o método de máxima verossimilhança, amplamente reconhecido por sua precisão na inferência evolutiva. Para assegurar a confiabilidade e robustez dos agrupamentos filogenéticos, foram realizadas 1000 réplicas de bootstrap, conferindo suporte estatístico aos nós da árvore. A análise filogenética foi conduzida por meio do software IQ-TREE, empregando o modelo de substituição nucleotídica GTR2. As demais sequências

nucleotídicas utilizadas foram obtidas a partir do banco de dados público NCBI usando os parâmetros descritos acima (TRIFINOPOULOS et al., 2016).

## Resultados e Discussão

Das 59 amostras analisadas, 21 amplificaram positivamente para o gene *nifH*, sendo consideradas como fixadoras de nitrogênio em potencial. Com o banco de dados criado a partir do GenBank, as sequências foram identificadas a nível de espécie, classificadas também quanto ao hábito de crescimento endofítico ou epifítico (Tabela 1). Entre as amostras positivas para o gene *nifH*, 52,4% apresentaram hábito de crescimento endofítico e 47,6% epifíticos. Esta distribuição demonstrou que não houve preferência estatisticamente significativa que separasse as bactérias positivas pro *nifH* a partir do hábito de crescimento. A maioria destas amostras apresentou elevados valores de cobertura (Query Cover) e percentual de identidade (Per. Identif.), indicando uma alta confiabilidade nos resultados de identificação taxonômica (Tabela 1). O valor de “Query Cover” representa o quanto da sequência da amostra se alinha com a sequência de referência (GenBank), enquanto o percentual de identidade indica o grau de similaridade entre as sequências, considerando apenas a região coberta pelo alinhamento (JEUNEN et al., 2023). Os valores de e-VALUE representam a significância estatística do alinhamento e valores próximos de zero indicam um alinhamento altamente confiável (ALTSCHUL et al., 1990) (Tabela 1).

As 21 amostras positivas para o gene *nifH* foram sequenciadas, destas foram identificados oito gêneros bacterianos, entre eles: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus*. O gênero mais abundante foi *Alcaligenes*, com sete amostras identificadas, distribuídas entre duas espécies: *Alcaligenes faecalis* e *Alcaligenes nematophilus*. Dentre essas, apenas a amostra seq8 apresentou um valor de cobertura consideravelmente baixo (57%), o que pode indicar uma identificação com baixa confiabilidade. Algumas identificações se mostraram inesperadas, como *Myroides odoratimimus* e *Staphylococcus epidermidis*, uma vez que não há evidências na literatura de que esses microorganismos sejam diazotróficos (Holguin; Bashan, 1996; Kaur; Kaur, 2021). Tais casos indicam a necessidade de uma investigação mais aprofundada quanto à veracidade da identificação taxonômica e a funcionalidade do gene *nifH* detectado.

A amostra seq4, identificada como *Klebsiella* sp., também apresentou valores de cobertura e identidade baixos. Uma das possíveis causas é a insuficiência de representatividade do banco de dados de referência, que necessita ser ampliado com mais sequências, especialmente de amostras provenientes de regiões brasileiras. A escassez de dados regionais pode comprometer a eficiência na identificação de microrganismos de localidades específicas, como as cangas (CARVALHO, 2022).

**Tabela 1.** Identificação de 21 sequências bacterianas com base em análises BLAST (NCBI).

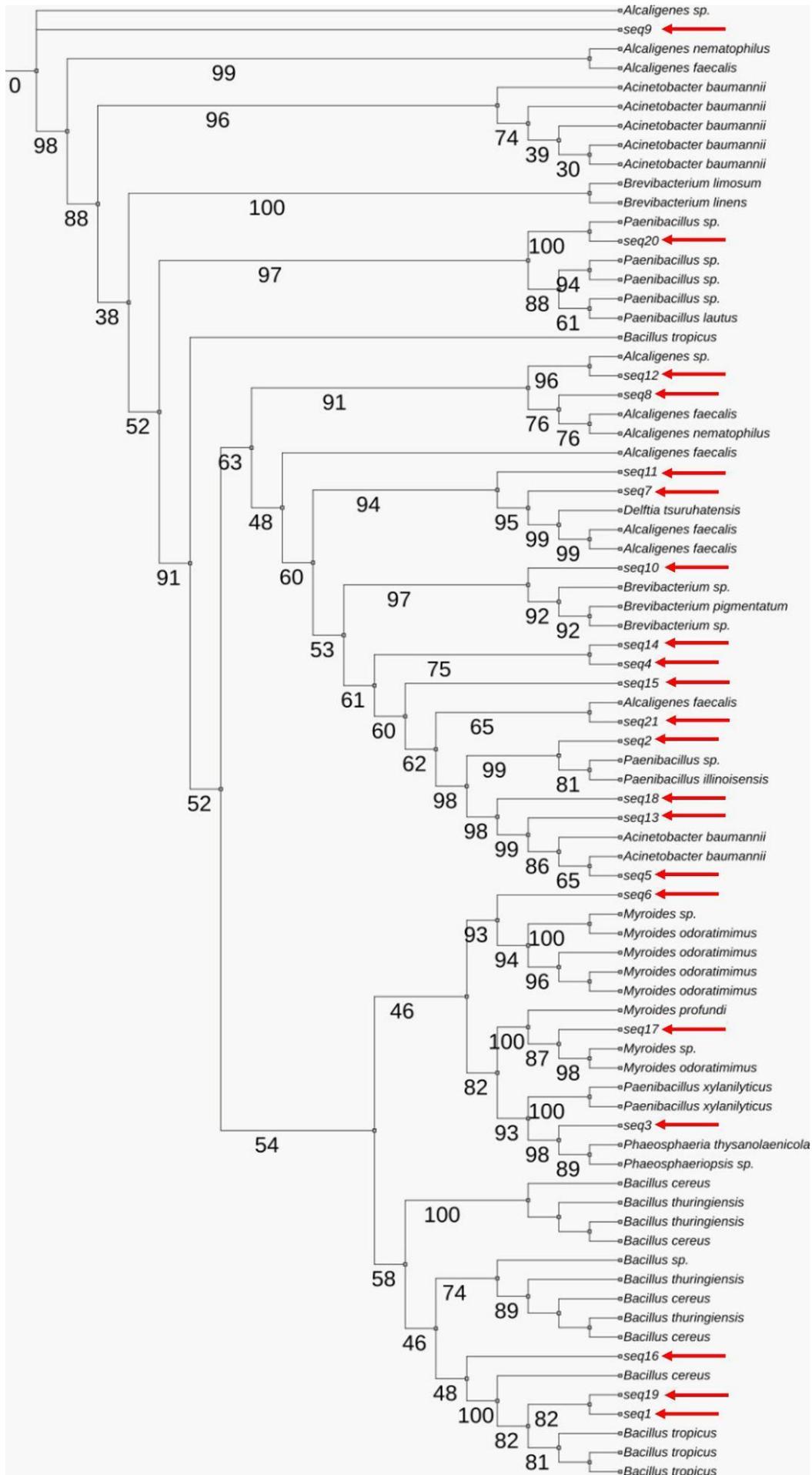
Amostra	Nome científico	Hábito de crescimento	Strain	Query Cover	e-VALUE	Per. Identif.	Accession
seq5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Epifítico	F20AB02	99%	0.0	90.98%	CP142640.1
seq13	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Epifítico	H20AB06	95%	0.0	92.15%	CP146836.1
seq7	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Epifítico	c16	83%	8E-179	94.54%	CP023256.1
seq8	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Epifítico	AU14	57%	1E-107	92.18%	CP031747.1
seq9	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Endofítico	D334	86%	2E-170	92.31%	CP095873.1
seq11	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Endofítico	c16	83%	2E-180	94.96%	CP023256.1
seq12	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Epifítico	c16	82%	2E-150	90.65%	CP023256.1
seq14	<i>Alcaligenes nematophilus</i>	Endofítico	MBGG1_DBT-NECAB	84%	0.0	96.92%	CP088159.1
seq15	<i>Alcaligenes nematophilus</i>	Endofítico	MBGG1_DBT-NECAB	84%	7E-175	93.29%	CP088159.1
seq16	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Endofítico	HD521	84%	2E-174	93.52%	CP010106.1
seq18	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Epifítico	c25	84%	1E-172	93.44%	CP022345.1
seq1	<i>Bacillus tropicus</i>	Endofítico	BC3	82%	2E-175	94.09%	CP020937.1
seq19	<i>Bacillus tropicus</i>	Endofítico	BC3	86%	0.0	95.43%	CP020937.1
seq10	<i>Brevibacterium limosum</i>	Epifítico	o2	82%	1E-137	89.23%	CP050154.1

seq4	<i>Klebsiella sp.</i>	Endofítico	----	13%	8E-10	89.23%	OQ790081.1
seq6	<i>Myroides odoratimimus</i>	Endofítico	PR63039	83%	9E-159	91.55%	CP013690.1
seq17	<i>Myroides odoratimimus</i>	Endofítico	PR63039	82%	1E-152	91.00%	CP013690.1
seq20	<i>Paenibacillus sp.</i>	Endofítico	BR1-192	83%	4E-167	93.05%	CP120718.1
seq21	<i>Paenibacillus sp.</i>	Epifítico	BR1-192	83%	0,7	2E-114	CP120718.1
seq2	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	Epifítico	L-2	81%	7E-155	91.43%	CP182582.1
seq3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Epifítico	32FSE02	86%	1E-167	92.20%	CP121486.1

A árvore filogenética foi criada para compreender as relações entre as bactérias que possuíam o gene *nifH*, a partir dos isolados testados (Fig. 2). O esperado era que os isolados se agrupassem filogeneticamente de acordo com sua classificação taxonômica. No entanto, observou-se que, por exemplo, as amostras atribuídas ao gênero *Alcaligenes* apresentaram dispersão ao longo de diferentes ramos da árvore filogenética, indicando uma incongruência entre a filogenia e a taxonomia atribuída, o mesmo ocorreu com o grupo de *Acinetobacter baumannii*. Mesmo utilizando sequências de referência provenientes do banco de dados do NCBI, essa divergência sugere a existência de inconsistências na curadoria taxonômica dessas sequências do banco de dados. Tais resultados reforçam a necessidade de uma revisão criteriosa e contínua desses bancos de dados, uma vez que erros de anotação ou classificações incorretas podem comprometer a acurácia das análises filogenéticas e ecológicas baseadas em sequências gênicas (CHORLTON, 2024).

Apesar da dispersão observada nas amostras de referência, as sequências de *Alcaligenes faecalis* (seq7, seq11 e seq12) apresentaram um bom agrupamento, com valor de bootstrap superior a 90%. *A. faecalis*, assim como o gênero *Alcaligenes*, é amplamente estudado por seu potencial de aplicação sustentável, especialmente em áreas degradadas. Além da capacidade de fixar nitrogênio, essa bactéria apresenta potencial para a biorremediação de diversos contaminantes, incluindo metais pesados, e também possui propriedades antibióticas (RAY; PATTNAIK, 2024). Tais características podem conferir vantagens adaptativas que permitem sua ocorrência em diversos nichos ecológicos, como as cangas.

As sequências de *Bacillus tropicus* (seq1 e seq19) também apresentaram um agrupamento consistente, com valor de suporte de 82%. Por outro lado, *Bacillus thuringiensis* (seq16) manteve-se dentro do gênero, enquanto a sequência seq18 apresentou-se bastante deslocada. O gênero *Bacillus* é amplamente distribuído em solos de diferentes ambientes e é extensamente explorado pela indústria biotecnológica, principalmente na agricultura, devido ao seu potencial funcional (SAXENA et al., 2020; YOUSUF et al., 2017). As sequências de *Myroides odoratimimus* (seq6 e seq17) também apresentaram agrupamento conforme o esperado, com valores de bootstrap de 93% e 87%, respectivamente. Da mesma forma, *Acinetobacter baumannii* (seq5 e seq13) também se agruparam corretamente. No entanto, ambas as espécies são mais reconhecidas e estudadas por seus potenciais patogênicos. Há, entretanto, alguns estudos que relacionam espécies distintas desses gêneros com a promoção do crescimento de plantas, o que indica que ainda existem diversas lacunas a serem investigadas quanto às funções ecológicas desses microrganismos (KAUR; KAUR, 2021; KUAN et al., 2016).



◄ **Figura 2.** Árvore filogenética baseada no banco de dados construído pelo CRABS, unindo 21 sequências do gene *nifH* obtidas neste estudo com sequências de referência do NCBI. A inferência foi realizada por máxima verossimilhança (IQ-TREE, modelo GTR2) com 1000 réplicas de bootstrap. A topologia da árvore evidencia a diversidade taxonômica dos gêneros e a conservação do gene *nifH* entre os isolados, identificados pelo prefixo “Seq” seguido do número da amostra.

A sequência seq20, identificada como *Paenibacillus*, e seq10 como *Brevibacterium limosum* apresentaram valores de agrupamento elevados, com bootstrap de 100% e 97%, respectivamente. Há estudos que relatam a associação de espécies do gênero *Paenibacillus* com o ambiente, especialmente com a rizosfera de plantas (LIU et al., 2019). Esses microrganismos são amplamente reconhecidos por suas múltiplas propriedades benéficas, como a fixação de nitrogênio e a solubilização de fosfato (LIU et al., 2019).

## Conclusão

Este estudo busca compreender a dinâmica entre microrganismos e o ambiente, principalmente aqueles que ocorrem em uma região com condições únicas e desfavoráveis. Nesses ambientes, a capacidade de fixação biológica de nitrogênio representa um fator limitante, influenciando diretamente a produtividade vegetal, o desenvolvimento das comunidades vegetais e o uso sustentável do solo. Como essas bactérias vivem com condições tão inóspitas, há a possibilidade de investigar a efetividade de inoculação desses microrganismos em áreas degradadas e com condições tão extremas quanto as cangas, mas também em áreas agrícolas da região.

Vale ressaltar que quando falamos de microrganismos, em destaque bactérias, a taxonomia, é essencial para alimentar os bancos de dados e para a identificação correta destes táxons. No entanto, essa classificação deve estar integrada a estudos ecológicos e funcionais que investiguem o papel desses organismos em seus habitats naturais. Estudos como este visam destacar a importância da diversidade microbiana e seu potencial de aplicação como ferramenta biotecnológica para a melhoria da qualidade e da funcionalidade do solo.

Além disso, destaca-se a importância crescente de pesquisas que contribuam para o enriquecimento dos bancos de dados de espécies nativas, os quais ainda são majoritariamente compostos por estudos internacionais. Essa demanda é ainda mais urgente em regiões como a nossa, que apresentam alta taxa de endemismo e uma biodiversidade singular ainda pouco explorada do ponto de vista molecular. O sequenciamento e a

caracterização de microrganismos locais são fundamentais para ampliar e aprimorar as análises baseadas em biologia molecular, garantindo maior representatividade e acurácia nas inferências taxonômicas e funcionais.

## Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, Stephen F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ANDREATA, Matheus FL et al. Microbial fertilizers: A study on the current scenario of brazilian inoculants and future perspectives. **Plants**, v. 13, n. 16, p. 2246, 2024.

BLESS, A.; DAVILA, F.; PLANT, R. A genealogy of sustainable agriculture narratives: implications for the transformative potential of regenerative agriculture. **Agriculture and Human Values**, v. 40, n. 4, p. 1379–1397, dez. 2023.

BRASIL. **Brasil amplia produção de fertilizantes para a agricultura brasileira com nova fábrica**. *Portal Brasil*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/brasil-amplia-producao-de-fertilizantes-para-a-agricultura-brasileira-com-nova-fabrica>. Acesso em: 5 abr. 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Plano Nacional de Fertilizantes. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/plano-nacional-de-fertilizantes/o-plano-nacional-de-fertilizantes>. Acesso em: 13 mar. 2025.

CARVALHO, D. C. Ichthyoplankton DNA metabarcoding: Challenges and perspectives. **Molecular Ecology**, v. 31, n. 6, p. 1612-1614, 2022.

CHORLTON, S. D. Ten common issues with reference sequence databases and how to mitigate them. **Frontiers in Bioinformatics**, v. 4, p. 1278228, 2024.

CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R.; SCHIMEL, D. S.; FISHER, H.; HOWARTH, R. W.; HEDIN, L. O.; PERAKIS, S. S.; LATTY, E. F.; VON FISCHER, J. C.; ELSEROAD, A.;

WASSON, M. F. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation in natural ecosystems. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 13, n. 2, p. 623–645, 1999.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). *Boletim Logístico: Brasil registra aumento nas importações de fertilizantes em 2024*. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5910-boletim-logistico-brasil-registra-aumento-nas-importacoes-de-fertilizantes-em-2024>. Acesso em: 9 abr. 2025.

DUQUE, T. S. PINHEIRO, R. A.; SOUZA, I. M., SILVA, G. G., SOARES, M. A.; BARBOSA DOS SANTOS, J. Herbicides and bio-inputs: Compatibility and challenges for sustainable agriculture. **Chemosphere**, v. 369, p. 143878, 2024.

EWERE, E. E. WHITE, S.; MAULEON, R.; BENKENDORFF, K. Soil microbial communities and degradation of pesticides in greenhouse effluent through a woodchip bioreactor. **Environmental Pollution**, v. 359, p. 124561, 2024.

GABY, J. C.; BUCKLEY, D. H. A comprehensive aligned *nifH* gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria. **Database**, v. 2014, 2014.

GABY, J. C.; BUCKLEY, D. H. A global census of nitrogenase diversity. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 1790–1799, jul. 2011.

GARCIA, G., CARDOSO, A. A., SANTOS, O. A. M. D. Da escassez ao estresse do planeta: um século de mudanças no ciclo do nitrogênio. **Química Nova**, v. 36, p. 1468-1476, 2013

HALBLEIB, C. M.; LUDDEN, P. W. Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1081–1084, 2000.

HOLGUIN, G.; BASHAN, Y. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 12, p. 1651-1660, 1996.

IZQUIERDO, J. A.; NÜSSLEIN, K. Distribution of Extensive *nifH* Gene Diversity Across Physical Soil Microenvironments. **Microbial Ecology**, v. 51, n. 4, p. 441–452, 2006.

JEUNEN, G.-J.; DOWLE, E.; EDGECOMBE, J. VON AMMON, U.; GEMMELL, N. J.; CROSS, H. crabs – A software program to generate curated reference databases for

metabarcoding sequencing data. **Molecular Ecology Resources**, v. 23, n. 3, p. 725-738, 2023.

KAUR, R.; KAUR, S. Plant growth-promoting potential of '*Myroides gitamensis*' isolated from virgin soils of Punjab. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 5, p. 2551-2561, 2021.

KRAUSE, Andrea et al. Complete genome of the mutualistic, N<sub>2</sub>-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 1384-1390, 2006.

KUAN, K. B.; OTHMAN, R.; ABDUL RAHIM, K.; SHAMSUDDIN, Z. H. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. **PloS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0152478, 2016.

LAU, M. C. Y.; CAMERON, C.; MAGNABOSCO, C.; BROWN, C. T., SCHILKEY, F.; GRIM, S.; HENDRICKSON, S.; PULLIN, M.; SHERWOOD LOLLAR, B.; VAN HEERDEN, E.; KIEFT, T. L.; ONSTOTT, T. C. Phylogeny and phylogeography of functional genes shared among seven terrestrial subsurface metagenomes reveal N-cycling and microbial evolutionary relationships. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 531, 2014.

LIU, X.; LI, Q.; LI, Y.; GUAN, G.; CHEN, S. *Paenibacillus* strains with nitrogen fixation and multiple beneficial properties for promoting plant growth. **PeerJ**, v. 7, p. e7445, 2019.

MACKENZIE, F. T. **Our Changing Planet: An Introduction to Earth System Science and Global Environmental Change**, 4th Edition, Pearson, 2010.

MAZID, M.; KHAN, T. A. Future of bio-fertilizers in Indian agriculture: an overview. **International Journal of Agricultural and Food Research**, v. 3, n. 3, 2015.

OHYAMA, T. Nitrogen as a major essential element of plants. **Nitrogen Assim. Plants**, v. 37, p. 1–17, 2010.

PAHALVI, H. N.; RAFIYA, L.; RASHID, S.; NISAR, B.; KAMILI, A. N. Chemical fertilizers and their impact on soil health. In: DAR, G. H.; BHAT, R. A.; MEHMOOD, M. A.; HAKEEM, K. R. (eds.). **Microbiota and Biofertilizers, Vol 2: Ecofriendly tools for reclamation of degraded soil environs**, p. 1-20, 2021.

- POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in microbiology**, v. 152, n. 1, p. 95–103, 2001.
- RAY, R. R.; PATTNAIK, S. *Alcaligenes faecalis*: A bacterium for sustainable management of environment. **Environmental Quality Management**, v. 34, n. 1, p. e22189, 2024.
- RAYMOND, J. SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E. The Natural History of Nitrogen Fixation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 3, p. 541–554, 2004
- RUBIO, L. M.; LUDDEN, P. W. Biosynthesis of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 93–111, 2008.
- SÁEZ-SANDINO, T. DELGADO-BAQUERIZO, M.; EGIDI, E.; SINGH, B. K. New microbial tools to boost restoration and soil organic matter. **Microbial Biotechnology**, v. 16, n. 11, p. 2019-2025, 2023.
- SATAPUTE, P. P.; OLEKAR, H. S.; SHETTI, A. A.; KULKARNI, A. G.; HIREMATH, G. B.; PATAGUNDI, B. I.; SHIVSHARAN, C. T.; KALIWAL, B. B. Isolation and characterization of nitrogen fixing *Bacillus subtilis* strain as-4 from agricultural soil. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 3, n. 9, p. 762-765, 2012.
- SAVCI, S. Investigation of effect of chemical fertilizers on environment. **Apcbee Procedia**, v. 1, p. 287-292, 2012.
- SAXENA, A. K.; KUMAR, M.; CHAKDAR, H.; ANUROOPA, N.; BAGYARAJ, D. J. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 6, p. 1583–1594, 2020.
- SEMENOV, M. V. Metabarcoding and metagenomics in soil ecology research: achievements, challenges, and prospects. **Biology Bulletin Reviews**, v. 11, n. 1, p. 40-53, 2021.
- TAKAHASI, A.; MEIRELLES, S. T. Ecologia da vegetação herbácea de bancadas lateríticas (cangas) em Corumbá, MS, Brasil. **Hoehnea**, v. 41, n. 4, p. 515–528, 2014.
- TIAN, L.; DENG, Y.; JIANG, H. Comparing the benthic nitrogenase activity and diazotrophic community assembly of three large river-connected freshwater lakes in eastern China. **Journal of Environmental Sciences**, v. 150, p. 134–148, 2025.

- TRIFINOPOULOS, J.; NGUYEN, L. T.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W232–W235, 2016.
- VIANA, P. L.; MOTA, N. F. O.; GIL, A. S. B.; SALINO, A.; ZAPPI, D. C.; HARLEY, R. M.; ILKIU-BORGES, A. L.; SECCO, R. S.; ALMEIDA, T. E.; WATANABE, M. T. C.; SANTOS, J. U. M.; TROVÓ, M.; MAURITY, C.; GIULIETTI, A. M. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: história, área de estudos e metodologia. **Rodriguésia**, v. 67, n. 5 spe, p. 1107-1124, 2016.
- VIANA, T. F. C.; CAMPELO, A. P. S.; BALDANI, J. I.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; BALDANI, V. L. D.; SILVA, W. M.; PAGGI, G. M.; BRASIL, M. S. Cultivable bacterial diversity associated with bromeliad roots from ironstone outcrops in central Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 4, p. 872–880, dez. 2020.
- VIDAL, M. C.; AMARAL, D. F. S.; NOGUEIRA, J. D.; MAZZARO, M. A. T.; LIRA, V. M. C. Bioinsumos: a construção de um Programa Nacional pela Sustentabilidade do Agro Brasileiro. **Economic Analysis of Law Review**, v. 12, n. 3, p. 557-574, 2021.
- WANG, Y.; ZHU, Y.; ZHANG, S.; WANG, Y. What could promote farmers to replace chemical fertilizers with organic fertilizers?. **Journal of cleaner production**, v. 199, p. 882-890, 2018.
- XIE, Jian-Bo et al. Comparative genomic analysis of N<sub>2</sub>-fixing and non-N<sub>2</sub>-fixing *Paenibacillus* spp.: organization, evolution and expression of the nitrogen fixation genes. **PLoS genetics**, v. 10, n. 3, p. e1004231, 2014.
- YOUSUF, J.; THAJUDEEN, J.; RAHIMAN, M.; KRISHNANKUTTY, S.; ALIKUNJ, A. P.; ABDULLA, M. H. A. Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions. **Journal of basic microbiology**, v. 57, n. 11, p. 922-932, 2017.
- ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental microbiology**, v. 5, n. 7, p. 539-554, 2003.
- 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**, v. 55, n. 10, p. 2522–2526, 1989.

ZHANG, Xiao et al. Isolation, identification and characterization of nitrogen fixing endophytic bacteria and their effects on cassava production. **PeerJ**, v. 10, p. e12677, 2022.