

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
MATO GROSSO**

CAMPUS CUIABÁ - BELA VISTA

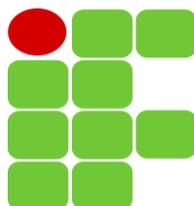
DEPARTAMENTO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM GESTÃO AMBIENTAL

ROBERTA DAMIÃ MELO ALVES

**DIVERSIDADE MICROBIANA COMPARATIVA DOS PARQUES
URBANOS DE CUIABÁ-MT, COM O USO DE CULTIVOS
CONVENCIONAIS E FERRAMENTAS MOLECULARES**

**Cuiabá
2017**



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
MATO GROSSO**

CAMPUS CUIABÁ - BELA VISTA

DEPARTAMENTO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM GESTÃO AMBIENTAL

ROBERTA DAMIÃ MELO ALVES

**DIVERSIDADE MICROBIANA COMPARATIVA DOS PARQUES
URBANOS DE CUIABÁ-MT, COM O USO DE CULTIVOS
CONVENCIONAIS E FERRAMENTAS MOLECULARES**

Trabalho de Conclusão Curso apresentado ao curso de Tecnólogo em Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso, Campus Cuiabá Bela Vista, para obtenção de título de graduado, sob a orientação da professora Dr^a Sandra Mariotto.

Coorientadores: Dr^a. Selma Batista e Professor Pedro Araujo Campos.

**Cuiabá
2017**

**Divisão de Serviços Técnicos. Catalogação da Publicação na Fonte. IFMT Campus
Cuiabá Bela Vista
Biblioteca Francisco de Aquino Bezerra**

A474d

Alves, Roberta Damiã Melo.

Diversidade microbiana comparativa dos parques urbanos de Cuiabá – MT, com o uso de cultivos convencionais e ferramentas moleculares. / Roberta Damiã Melo Alves. _ Cuiabá, 2017.

41 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Mariotto

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Selma Batista

Co-Orientador: Prof. Pedro Araujo Campos

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)_ Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Mato Grosso. Campus Cuiabá – Bela Vista. Curso Superior de Tecnologia em Gestão Ambiental.

1. Microbiota do solo – TCC. 2. Áreas verdes urbanas – TCC. 3. rDNA – TCC. I. Mariotto, Sandra. II. Batista, Selma. III. Campos, Pedro Araujo. IV. Título.

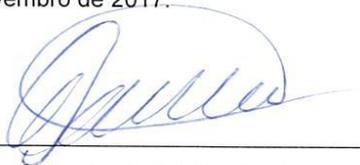
IFMT CAMPUS CUIABÁ BELA VISTA CDU 504(079.1)
CDD 504.06.98172

ROBERTA DAMIÃ MELO ALVES

**DIVERSIDADE MICROBIANA COMPARATIVA DOS PARQUES URBANOS DE
CUIABÁ-MT, COM O USO DE CULTIVOS CONVENCIONAIS E FERRAMENTAS
MOLECULARES**

Trabalho de Conclusão de Curso em Tecnologia em Gestão Ambiental, submetido à Banca Examinadora composta pelos Professores do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso Campus Cuiabá Bela Vista como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Graduado.

Aprovado em 28 de novembro de 2017.



Prof. Drª. Sandra Mariotto
Professora Orientadora – IFMT



Profª. Msc Fernanda Silveira
Membro da Banca- IFMT



Ricardo Firmino de Sousa
Doutorando em Ecologia e Conservação da Biodiversidade-UFMT
Membro da Banca

**Cuiabá - MT
Novembro de 2017**

Á Deus,

*Por me dar sabedoria na construção
desse trabalho de conclusão de curso.*

Á minha família,

*Por fazer de mim o melhor que eu poderia
ser.*

AGRADECIMENTOS

A todo corpo docente do IFMT, Campus Cuiabá-Bela Vista, pelo conhecimento adquirido.

Agradeço a Dra. Sandra Mariotto, minha orientadora, por estar presente me auxiliando com palavras de motivação diante das dificuldades surgidas no decorrer das análises moleculares. Possuo grande admiração pelo seu profissionalismo, inteligência e humanidade. “Professora, às vezes me pergunto: qual o sentido da vida? e ouço” “Roberta 5’→3”.

Ao professor coorientador Pedro Araujo de Campos por esclarecer dúvidas e ajudar na construção desta monografia.

A Dra Selma Baia Batista, minha coorientadora, que contribuiu muito em todas as práticas microbiológicas realizadas no desenvolvimento desta monografia.

Ao Msc Marcelo Costa, pela ajuda preciosa na parte estatística e na busca pelas licenças ambientais.

Ao professor Dr Jorge Silva, pelas importantes dicas e puxões de orelha na escrita do projeto de TCC.

A Msc Fernanda Silveira, pela colaboração em cada uma e todas as partes desse processo, sempre muito disposta a ajudar.

A Dra Elaine Coringa, por ser motivo de inspiração diante de tamanho conhecimento do assunto solos. Despertou em mim um gostar especial pelo assunto.

Agradeço aos meus amigos: a Stephanny de Mone Viegas Duarte, pelo tempo disponível em sanar minhas inquietações e ajudar na estruturação do meu trabalho; a Amanda Costa e Gabriela Fernanda, por se dispor a estar junto comigo na caminhada das coletas nos parques urbanos; a Flaíza Barros pelo mapa com as áreas de amostragem do meu TCC.

***“O papel dos infinitamente pequenos na natureza
é infinitamente grande”. Louis Pasteur***

***“Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes
três, mas o maior destes é o amor”. 1º Coríntios 13: 13***

RESUMO

Os parques urbanos são verdadeiros refúgios ecológicos, nos quais espécies animais e vegetais encontram abrigo e alimento, resultando numa maior abundância e diversidade dos seres vivos, em relação aos demais ambientes urbanos; e, contribuem de modo significativo para a qualidade de vida e o equilíbrio ambiental nas cidades. A microbiota do solo tem um papel crucial na regulação e no funcionamento dos ecossistemas, participando da ciclagem de nutrientes, essencial à boa qualidade do solo, bem como, contribui para a nutrição das plantas. Sendo assim, esta pesquisa teve como objetivo analisar a diversidade bacteriana nos solos dos parques urbanos de Cuiabá-MT, com o uso de cultivos convencionais, e identificar gêneros e espécies com o uso de ferramentas moleculares. Foram realizadas coletas em dois períodos do ano com três amostragens de solos de cada um dos parques: Tia Nair; Massairo Okamura; Mãe Bonifácia e Parque das Águas. Uma coleta na estação seca, que ocorreu no início do mês de setembro, e outra na estação chuvosa, no final do mês de outubro. Os resultados desta análise permitiram demonstrar que a biodiversidade bacteriana está atrelada ao grau de conservação da vegetação nativa desses parques. Em relação ao cultivo convencional, as análises dos morfotipos demonstraram variações nos distintos períodos, com maior diversidade na estação chuvosa em relação à estação seca. Nas análises moleculares, foram utilizadas colônias das placas de cultivo para obtenção do DNA bacteriano por extração térmica, e posterior amplificação via PCR da região rDNA 16S. Através do sequenciamento obteve-se a confirmação de uma maior diversidade de gêneros e espécies nos parques Mãe Bonifácia e Massairo Okamura em comparação aos parques Tia Nair e das Águas. Ferramentas de genética molecular permitem a identificação mais precisa e mais rápida para microrganismos, tendo em vista que os cultivos e análises convencionais são caros, demorados e, na maioria das vezes, inconclusivos.

Palavras-chaves: Microbiota do solo; Áreas verdes urbanas; rDNA.

ABSTRACT

Urban parks are real ecological refuges, in which animal and plant species find shelter and food, resulting in a greater abundance and diversity of living beings, compared to other urban environments; and contribute significantly to the quality of life and environmental balance in cities. Soil microbiota plays a crucial role in the regulation and functioning of ecosystems, participating in nutrient cycling, essential to good soil quality, as well contributing to plant nutrition. Thus, this research had the objective of analyzing the bacterial diversity in the soils of the urban parks at Cuiabá-MT, with the use of conventional crops, and to identify genera and species using molecular tools. Samples were collected in two periods of the year with three soil samples from each park: Tia Nair; Massairo Okamura; Mãe Bonifacia and Parque das Águas. One collection in the dry season, which occurred in early September, and another one in the rainy season, last week of October. The results of this analysis allowed to demonstrate that bacterial biodiversity is linked to the degree of conservation the native vegetation to these parks. In relation to conventional cultivation, morphotype analyzes demonstrated variations in the different periods, with greater diversity in the rainy season than to dry season. To molecular analyzes, colonies of the culture plates were used to obtain bacterial DNA by thermal extraction, and subsequent PCR amplification of the 16S rDNA region. Through sequencing was possible to confirm a high diversity of genera and species in the Mãe Bonifácia and Massairo Okamura parks compared to the Tia Nair and Parque das Águas. Genetics tools allow for more accurate and faster identification of microorganisms, than conventional cultures, that expensive, time-consuming, and most often not conclusive.

Keywords: Soil microbiota; Urban green areas; rDNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mapeamento dos pontos amostrados.	18
Figura 2: Áreas de coleta..	19
Figura 3: Procedimentos realizados em laboratório para obtenção, cultivo e identificação dos microrganismos	21
Figura 4: Morfotipos de isolados bacterianos crescidos em meio TSA	23
Figura 5: Gráfico evidenciando a diversidade de morfotipos bacterianos com coloração de Gram e sazonalidade e, imagem de bacilos Gram negativas visto em microscopia de campo claro. Aumento de 1000x.....	24
Figura 6: Comparativo entre os parques relacionando os períodos secos e chuvosos e os grupos de bactérias Gram positiva e Gram negativa.....	25
Figura 7: Comparativo entre os parques relacionando os períodos secos e chuvosos com as formas bacterianas.	26
Figura 8: Variável relacionada á forma bacteriana e os períodos secos e chuvosos dos Parques com maior área de vegetação nativa conservada.....	27
Figura 9: Representação em microscopia de campo claro dos dois grandes grupos bacterianos. Gram positiva (cor roxa) e Gram negativa na forma de bastonetes (cor vermelha), demonstrando que em seu plano de divisão celular obteve arranjos estreptobacilos... ..	28
Figura 10: Comparativo entre os parques relacionando os períodos secos e chuvosos e os arranjos morfológicos..	29
Figura 11: Quantidade geral de morfotipos por parques visualizados em microscopia de campo claro.....	30
Figura 12: Gel de eletroforese evidenciando as regiões amplificadas de rDNA 16S, a partir da PCR, de 1 a 7, com bandas de 400pb . No poço 9 do gel, a banda 16S Aer com cerca de 787pb. No número 10 o marcador comercial (Ladder).....	31
Figura 13: Identificação de gêneros/espécies de bactérias, via BLAST, após sequenciamento dos genes 16S rDNA e 16S Aer.....	32
Figura 14: Cultivo de bactérias em meio TSA. Fonte: Resultados da pesquisa.	40
Figura 15: Print de uma das sequências de PCR.....	40
Figura 16: Licenças ambientais.....	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 PARQUES URBANOS.....	13
2.2 MICRORGANISMOS DO SOLO.....	14
2.3 O CULTIVO CONVENCIONAL DA MICROBIOTA.....	15
2.4 FERRAMENTAS MOLECULARES COMO FATOR DE IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 TIPAGEM MORFOLÓGICA.....	22
4.2 TÉCNICAS MOLECULARES.....	30
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
6. REFERÊNCIAS.....	34
7. ANEXOS.....	37

1. INTRODUÇÃO

As áreas verdes urbanas são consideradas como o conjunto de áreas intraurbanas que apresentam cobertura vegetal, arbórea (nativa e introduzida), arbustiva ou rasteira (gramíneas) e que contribuem de modo significativo para a qualidade de vida e o equilíbrio ambiental nas cidades (MMA, 2012).

O MAPA (2002), salienta a importância que a microbiota do solo tem, desenvolvendo um papel crucial na regulação e no funcionamento dos ecossistemas, além de apresentar um importante papel econômico e biotecnológico.

Segundo a EMBRAPA (2002), pode se dizer que, indiscutivelmente, o maior celeiro do planeta reside na fração microbiana da biodiversidade. As limitações dos métodos tradicionais aliados aos avanços tecnológicos da biologia molecular faz com que técnicas moleculares sejam cada vez mais utilizadas nesses estudos.

A diversidade bacteriana é crítica para o funcionamento do ecossistema, devido à variedade de processos pelos quais são responsáveis as bactérias, com a decomposição e ciclagem de nutrientes, a agregação do solo e a patogenicidade (KENNEDY, 1999 *apud* MARTIN COBA, 2012).

Nas últimas décadas vem surgindo na biologia uma infinidade de campos e subcampos relacionados ao sequenciamento de genomas, que se trata do DNA total de um organismo. A princípio pode-se apresentar a falsa ideia em torno da possível facilidade em codificar, decifrar, as sequências das letras, A,T,C e G que são os chamados nucleotídeos, isso exige um trabalho minucioso. O conhecimento sobre a composição e fisiologia de microrganismos no solo, pode ser de grande auxílio nas técnicas de recuperação de áreas degradadas, além de despertar interesse biológico com os estudos desses genes (THOMPSON e THOMPSON, 2016).

De acordo com Hungria e Vargas (2003), hoje com o avanço obtido nas técnicas de biologia molecular, torna-se cada vez mais rotineira a análise do material genético: o genoma das bactérias. A avaliação genética tem sua importância particular e é decisiva, por exemplo, quando há necessidade de distinguir entre duas estirpes examinadas fenotipicamente muito parecidas, ou quase idêntica.

Devido a essas características, os microrganismos do solo são considerados como indicadores sensíveis para avaliar o impacto antropogênico sobre os

processos biológicos do solo (Dick, 1994; Doran & Parkinson, 1994; Turco et al., 1994).

Manfio (2003), também evidencia a preocupação com a sustentabilidade ambiental, ao destacar que o homem vem quebrando a relação harmoniosa com que a natureza sempre desenvolveu seus ciclos naturais. Diante deste cenário, se torna cada vez mais essencial o estudo da microbiota do solo dos parques urbanos, que representam um ponto de encontro de pessoas com intuito de realizar atividades físicas, além de serem locais que proporcionam aos seus usuários uma melhor qualidade ambiental urbana, sendo considerados fragmentos florestais de conservação e preservação ambiental de fauna e flora.

Foi objetivo do presente estudo, analisar a diversidade de bactérias em solos dos parques urbanos de Cuiabá-MT, através de cultivos convencionais e com ferramentas moleculares, visando correlacionar ao grau de antropização.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PARQUES URBANOS

Segundo Vila Nova e Guarim (2008), as vegetações nativas que antes ocupavam grandes áreas, além de estarem sendo destruídas rapidamente, são frequentemente divididas em grandes pedaços pela atividade humana. Quando a vegetação é destruída, fragmentos destas geralmente são deixados para trás, sendo afastados um dos outros pelas modificações que o homem impõe em sua paisagem.

De acordo com Melazo e Colesanti (2003, p. 5), com relação ao surgimento dos parques, (...)

os parques surgem como equipamentos urbanos complementares para as cidades urbano-industriais que surgiam proporcionando um local de lazer e recreação. A princípio, as idéias de parques na Inglaterra estavam ligadas ao modelo de jardins, com influências de culturas e artes orientais, modelados e planejados paisagisticamente de acordo com a disposição dos elementos naturais pré-existent.

Nos limites urbanos de uma cidade, a Unidade de Conservação geralmente presente, é denominada Parque Urbano. Dentre as várias classificações sobre parque urbano, Kliass (1993), define os parques urbanos:

[...] como espaços públicos com dimensões significativas e predominância de elementos naturais, principalmente cobertura vegetal, destinado à recreação. E ainda complementa que, na verdade o parque é um fato urbano de relativa autonomia interagindo com seu entorno e apresentando em seu bojo condições de absorver a dinâmica da estrutura urbana e dos hábitos da população.

GUARIM NETO (1991), destaca que a cobertura da área urbana de Cuiabá é constituída principalmente por áreas do Cerrado, Cerradão, Mata Ciliar e vegetação exótica. A vegetação nativa da região e as áreas remanescentes do Cerrado formam um verdadeiro cinturão em torno da área urbana.

A macro-zona urbana de Cuiabá, capital Matogrossense, possui 251,94 km² de área e localiza-se na província geomorfológica denominada Baixada Cuiabana, entre as coordenadas geográficas 15° 35' e 36'' de latitude sul e 56° 06' e 01'' de longitude Oeste de Greenwich.

A influência de área verde para o conforto térmico na cidade Cuiabá tem sido discutida, com objetivo de demonstrar a importância da cobertura vegetal. Pesquisando-se a história da urbanização na cidade percebe-se a correlação entre a urbanização mais intensa e o aumento da temperatura mínima média anual. A modificação dos parâmetros da superfície da atmosfera pela urbanização deu origem às chamadas ilhas de calor em Cuiabá-MT (MAITELLI, 1994; GUARIM e VILANOVA, 2008).

O termo “solos urbanos” refere-se a solos que se encontram no meio urbano e tem sido referenciado frequentemente em artigos científicos de revistas internacionais (PEDRON et al., 2004). A sociedade Internacional de Ciência do Solo (ISSC), também tem empregado este termo com frequência com especial atenção nos últimos congressos mundiais de ciência do solo, (França, 1998 e Tailândia, 2002). Desta forma, o termo “solos urbanos” teria a função de ressaltar o uso do solo e apontar para um conjunto de possíveis modificações nas suas propriedades, típicas do meio urbano.

2.2 MICRORGANISMOS DO SOLO

Russel (1973), em seu clássico livro “Soil Conditions and Plant Growth”, definiu como fértil o solo que tem, em formas acessíveis para as plantas, um estoque

adequado de nutrientes ou com uma população microbiana capaz de liberar, rapidamente os nutrientes necessários para assegurar o crescimento das plantas. Segundo este autor, solo infértil seria aquele que não reúne as condições acima mencionadas, como por exemplo, o solo destituído de microrganismos, ou onde estes imobilizem, em suas células, os nutrientes necessários para as plantas.

O isolamento e identificação de microrganismos a partir de fontes naturais tem sido uma ferramenta amplamente utilizada para obtenção de estirpes úteis e geneticamente estáveis. O estudo da diversidade de microrganismos do cerrado pode desvendar o efeito da perturbação no ecossistema, pode descobrir novos táxons com potencial para aplicações biotecnológicas; e principalmente, analisar a diversidade microbiana nestes ecossistemas. Analisar a comunidade obtida em diferentes locais é importante para compreender a distribuição das comunidades nestes sistemas (ALVARENGA, 2011).

Isoladamente, microrganismos decompositores de uma só espécie não são bioquimicamente versáteis, limitando-se a degradar alguns tipos de estruturas biológicas. No entanto, é a diversidade de microrganismos envolvida no processo de decomposição, que permite que espécies diferentes consigam quebrar estruturas bioquimicamente mais complexas. O trabalho conjunto de fungos e bactérias consegue decompor completamente plantas e animais mortos (RIBEIRO et al., 2016).

A qualidade do solo está relacionada à atividade microbiana, ou seja, a reações biológicas e bioquímicas catalisadas pelos microrganismos. Essas reações são responsáveis pela decomposição de resíduos de plantas, animais, industriais, pela ciclagem biogeoquímica, incluindo a fixação de Nitrogênio, pela formação de agregados do solo e pela taxa de decomposição de materiais orgânicos (ELSAS, 1997).

2.3 O CULTIVO CONVENCIONAL DA MICROBIOTA

Os microrganismos tal como outros organismos vivos necessitam de obter os nutrientes apropriados do seu meio ambiente. Assim, se queremos cultivar e

manter microrganismos vivos em laboratório faz-se necessário colocá-los em meios de cultura, contendo os nutrientes apropriados para o seu crescimento. Para além de nutrientes, é igualmente necessário que as condições de oxigénio (presença ou ausência), pH e pressão osmótica sejam adequadas ao crescimento desses microrganismos (SEELEY,1991).

O crescimento dos microrganismos nos diferentes meios de cultura utilizados fornece as primeiras informações para a sua identificação. É importante conhecer o potencial de crescimento de cada meio de cultura e adequar ao perfil bacteriano esperado para cada material. Alguns procedimentos são essenciais na hora da preparação de cada meio de cultura para a obtenção de melhores resultados e evitar contaminações, como nos diferentes casos: quando distribuir o meio antes de autoclavar, os tubos não precisam estar esterilizados; quando distribuir o meio após a autoclavação, os tubos, frascos, placas, pipetas e vidrarias ou materiais auxiliares obrigatoriamente devem ser estéreis e os meios devem ser autoclavados com as tampas semi abertas, para que a esterilização seja por igual em todo o conteúdo dos tubos - tampas fechadas não permitem a entrada do vapor (GRIFFITHS, 2006).

A contagem de microrganismos do solo em meios de cultura definidos, e posterior estudo de suas características sejam talvez o método mais comum de se avaliar a diversidade microbiana do solo (ATLAS, 1984). Apesar de simples e rápido, este método é insensível a mudanças rápidas nas comunidades microbianas, além de avaliar uma pequena porção da comunidade total de microrganismos do solo.

A contagem de microrganismos no solo é uma medida que poderá ser obtida diretamente por microscopia ou estimada por métodos indiretos, quando os propágulos existentes na amostra são capazes de formar colônias em meios artificiais. Dessa maneira, em qualquer que seja o método empregado, haverá seleção dos microrganismos, seja pelo meio de cultura utilizado ou pelas condições ambientais do cultivo. Esse procedimento detecta um número menor de espécies de microrganismos que ocorre naturalmente no solo, pois favorece o crescimento de um pequeno grupo de espécies de metabolismo rápido e adaptadas a sobreviver em solo relativamente deficiente em nutrientes (BROOKES & MCGRATH, 1984; JAHNEL 1997; ELSAS, 1997).

2.4 FERRAMENTAS MOLECULARES COMO FATOR DE IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES

A aplicação de técnicas moleculares em estudos de ecologia microbiana tem sido frequentemente utilizada para explorar a diversidade microbiana e analisar a estrutura das comunidades existentes. As abordagens moleculares independentes da cultura provaram serem ferramentas poderosas na criação de um inventário mais completo da diversidade microbiana em amostras ambientais; e, técnicas de PCR como: Nested PCR e Box PCR tendo sido aplicadas para avaliar a microbiota do solo. A avaliação da diversidade em solo de Cerrado é um aspecto importante na busca da manutenção da biodiversidade deste solo (MMA, 2010).

A extração de DNA do solo envolve basicamente a ruptura de células microbianas presentes na amostra, e, portanto, DNA de um grande número de microrganismos. Quanto maior a diversidade microbiana no solo mais sequências diferentes de DNA serão encontradas nas amostras; porém, o conjunto de *primers* apropriados é de extrema importância, para confirmar e ampliar os resultados encontrados (ALVARENGA, 2011).

Os métodos de eletroforese que são utilizados a partir da PCR, consistem em separação e visualização de fragmentos de DNA em gel de eletroforese de acordo com as diferenças em suas sequências de nucleotídeos. A riqueza de espécies, um dos parâmetros de biodiversidade, pode ser estimada a partir de números de bandas obtidas ao fim da análise, mudanças ocorridas entre os membros da comunidade e também a identificação filogenética dos mesmos (ASCHER, 2010).

A técnica de sequenciamento das regiões amplificadas, a partir da PCR, em regiões de DNA com até 900 pares de base de comprimento, são rotineiramente sequenciados pelo chamado método Sanger de sequenciamento ou método de terminação da cadeia. O método Sanger foi desenvolvido pelo bioquímico britânico Fred Sanger e seus colaboradores, em 1977.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram realizados nos parques Tia Nair (TN), Parque das Águas (PA), Mãe Bonifácia (MB) e Parque Massairo Okamura (MO), (figura 1).

Foram realizadas duas coletas de amostra de solos, sendo uma na estação seca no início de setembro de 2017 e outra na estação chuvosa no final de outubro de 2017.

O delineamento experimental foi realizado em três pontos estratégicos nos parques, considerados neste trabalho, arbitrariamente, como: a) áreas vegetação exótica, b) áreas vegetação semi nativa, e c) áreas mata nativa. Os parques Tia Nair e Parque das águas serão de referências de área alterada, já o parque Mãe Bonifácia e o Massairo Okamura serão considerados como área testemunha, devido a maior conservação de mata nativa.

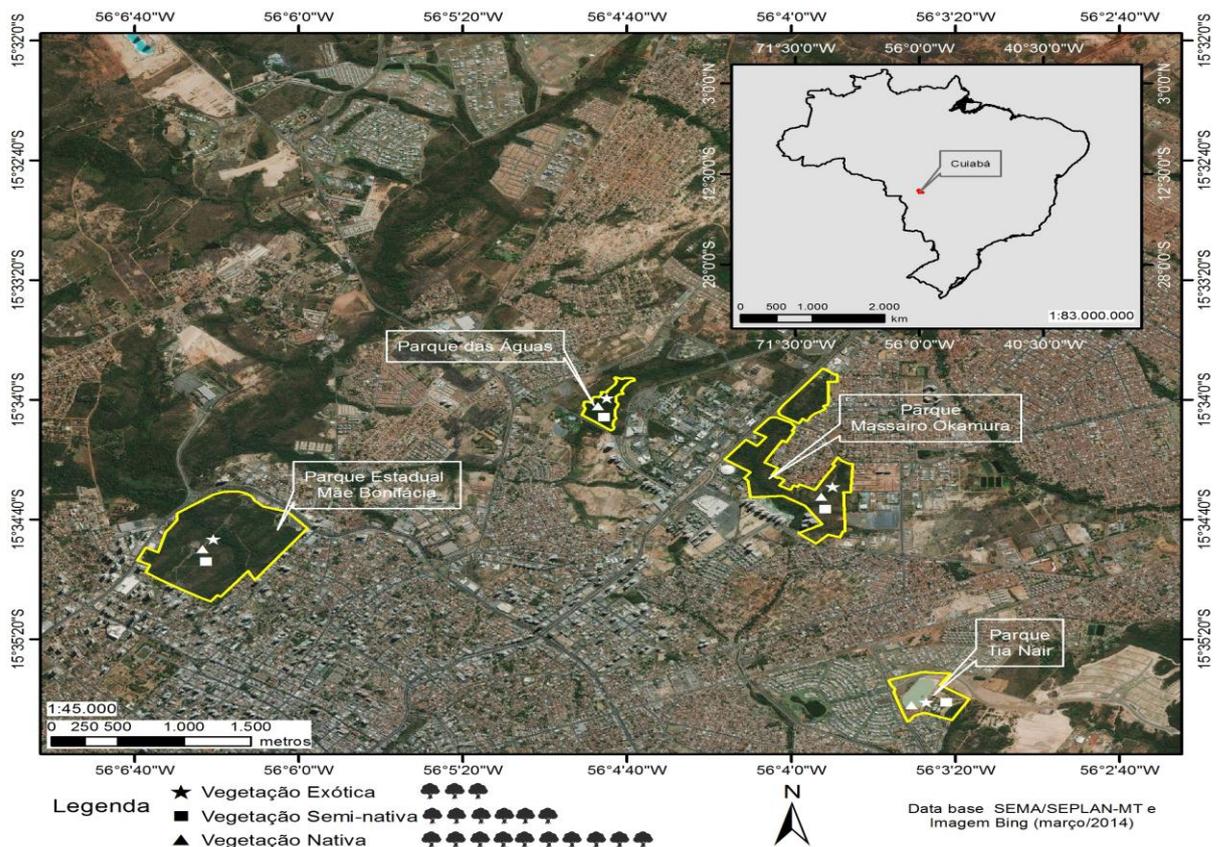


Figura 1: Mapeamento dos pontos amostrados. Polígonos: Estrela, Retângulo e Triângulo referem-se as três áreas coletadas por parque. Fonte: Resultados da pesquisa.

Em cada área de coleta foram delimitados três pontos de 1m²; dentro desse quadrante foi traçada uma linha em diagonal, coletando três subamostras simples, formando uma amostra composta, com uma profundidade de até 20 cm, resultando em três amostras compostas de solo por parque (Figura 2). As amostras foram embaladas em sacos estéreis, vedadas e levadas para análise no laboratório de Biotecnologia (IFBiotec), do Instituto Federal de Mato Grosso, Campus Cuiabá-Bela Vista.



Figura 2: Áreas de coleta. A- Parque MB; B- Parque PA; C- Parque MO e D- Parque TN. Fonte: Resultados da pesquisa.

Para o cultivo das bactérias foi utilizada a metodologia preconizada por Junqueira e Silveira (2010), com algumas modificações. Em tubos tipo falcom de 50 ml, contendo uma solução extratora (Tween 80, Pirofosfato de Sódio e pérolas de vidro), foram adicionadas 5 g de cada amostra de solo e posteriormente homogeneizadas em vórtex, para proceder a diluição seriada (até 10⁻⁶) em água destilada esterilizada e Cloreto de Sódio (solução salina). Foram preparadas placas de cultivo com o meio nutritivo Tryptone Soya Agar (TSA), que propicia o

crescimento de bactérias heterotróficas totais (BHT) e viabiliza a quantificação de bactérias do solo. Para o crescimento, foram pipetadas 100µl dessas diluições e inoculadas nas placas de Petri. As amostras foram incubadas entre 35 a 37°C para o crescimento das colônias por 48hs.

Para análises morfotintórias de Gram, desenvolvida em 1884 pelo bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram, foram coletadas colônias bacterianas com ponteiros estéreis e fixadas com alça drigalsk em lâminas de microscópio (esfregaço). Após, foram feitas as colorações com os corantes: cristal violeta, deixando um minuto e descartando o excesso, seguido de aplicação de iodo por um minuto. As lâminas foram lavadas com fio de água, cobriu-se com álcool 70%, e após remoção do álcool foi adicionado o corante fucsina, deixando agir por trinta segundos, para a lavagem final em água corrente.

Para a estimativa em percentual, das análises dos cultivos convencionais, utilizou-se a regra de três, relacionando três parques, doze áreas, três diluições e ao final, trinta e seis diluições que constam no quadro em anexo.

Para as técnicas moleculares foi extraído o DNA total das colônias através da lise térmica, técnica na qual consiste da coleta de colônias com ponteiros estéreis, as quais são diluídas em 100µl de água ultrapura, em microtubos, para posterior aquecimento e ruptura das células. Esses microtubos foram colocados em suportes e aquecidos a 95°C por 10min em banho maria. Posteriormente centrifugado por 10min a 13000 rpm, retirado o sobrenadante e colocado em novos microtubos autoclavados. Adicionou-se a enzima RNase para remover resíduos de RNA presentes na amostra e, após 5min, armazenados a -20°C.

Na Reação em Cadeia de Polimerase (PCR, desenvolvida por Kary Mullis em 1983) utilizou-se uma pequena alíquota do DNA extraído e um mix PCR, contendo os reagentes: 0,5µl de cada *primer* universal 16S (F e R), 0,75µl de Cloreto de Magnésio, 0,2µl da enzima DNA *Taq* polimerase, 2,5µl de tampão de equilíbrio da reação e 0,5µl de dinucleotídeos suficientes para a amplificação dos genes; finalizando com 1µl de DNA da amostra para compor ao final um volume de 25µl em cada microtubo da PCR.

Para a amplificação dos fragmentos dos genes 16S rDNA foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 968 Forward (5' AAC GCG AAG AAC CTT AC 3') e 1401 Reverse (5' CGG TGT GTA CAA GAC CC 3' (Nubel et al., 1996)) e, para a identificação das espécies, foi realizada a técnica de RFLP-PCR, gene 16S rDNA,

segundo protocolo proposto por Borrel et al., 1997, com uso dos *primers* 16SAer-F 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' e 16SAer-R 5'- GGTTACCTT GTTACGACTT-3'. As temperaturas dos três ciclos foram: 94°C 2'; 94°C 45"; 55°C 45" e extensão a 72°C 7'; 4°C.

Para verificar a amplificação do gene 16S via PCR utilizou-se um gel de agarose em tampão de eletroforese, com o uso de um fluoróforo aderente ao DNA amplificado (GelRed®, Biotium), o qual aparece excitado sob a luz UV do transiluminador. Para o controle padrão de bandas positivas, utilizou-se um DNA *Ladder* comercial 100kb (Kasvi) com fragmentos de pesos moleculares conhecidos.

Para verificar a integridade das sequências foi utilizado o programa Geneious 7.1, disponível *online*. Estas foram posteriormente comparadas com organismos já identificados (disponíveis no BLAST- www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi....) para verificar o grau de similaridade genética.

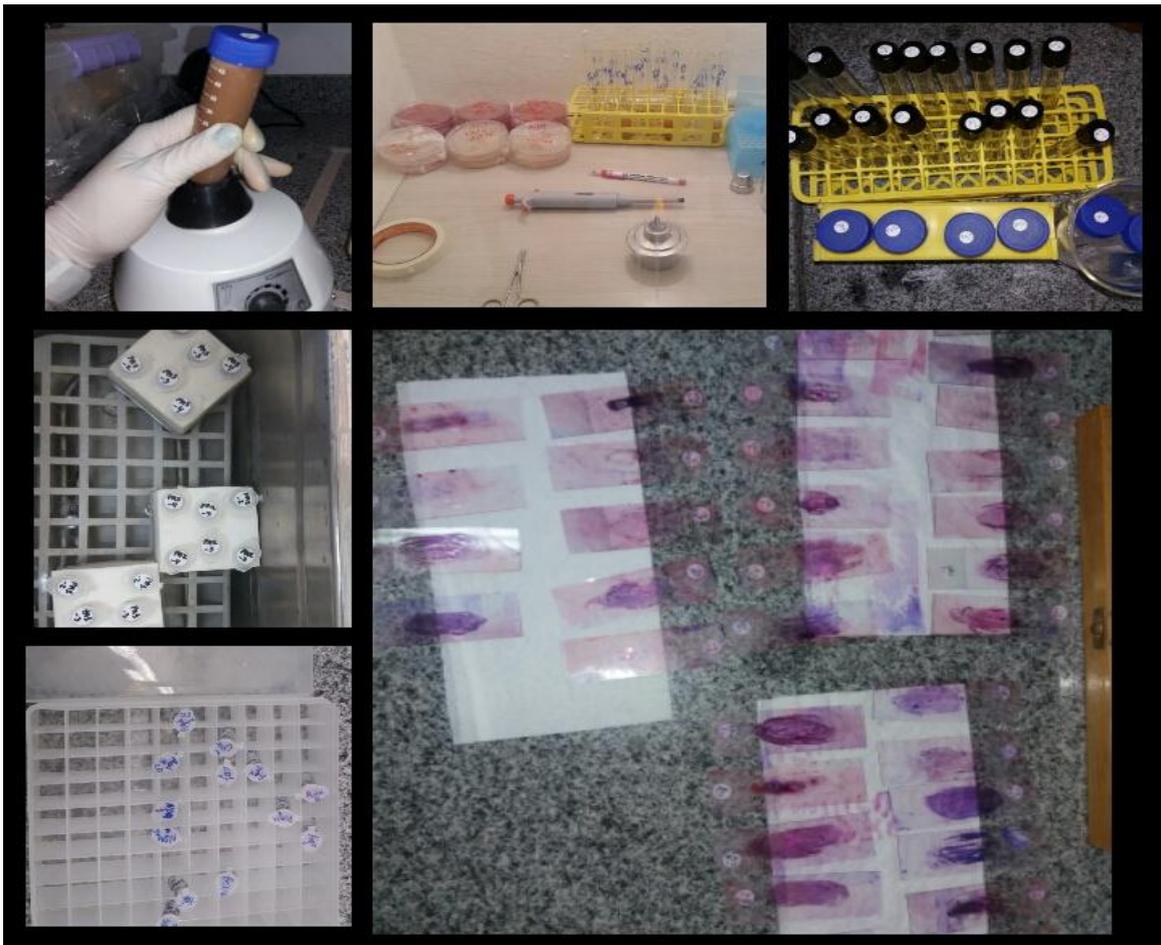


Figura 3: Procedimentos realizados em laboratório para obtenção, cultivo e identificação dos microrganismos. Fonte: Resultados da pesquisa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TIPAGEM MORFOLÓGICA

No ambiente, os microrganismos encontram os nutrientes nas mais variadas formas de elementos orgânicos e/ou inorgânicos com funções de promover o seu crescimento. As avaliações de diversidade microbiana fornecem indicativos sobre a variedade e a variabilidade, em termos de número (riqueza) e abundância (equitividade), de espécies presentes no solo (MENDES et al., 2011).

Desta forma, em laboratório usam-se meios de cultivo que forneçam às bactérias as condições mais próximas daquelas encontradas em seu habitat, e a partir disso, espera-se que cresçam de forma satisfatória. Nestes meios, foram distribuídas as alíquotas das amostras coletadas para observação da morfologia colonial, as quais cresceram satisfatoriamente, de acordo com o que se evidencia na figura 4.

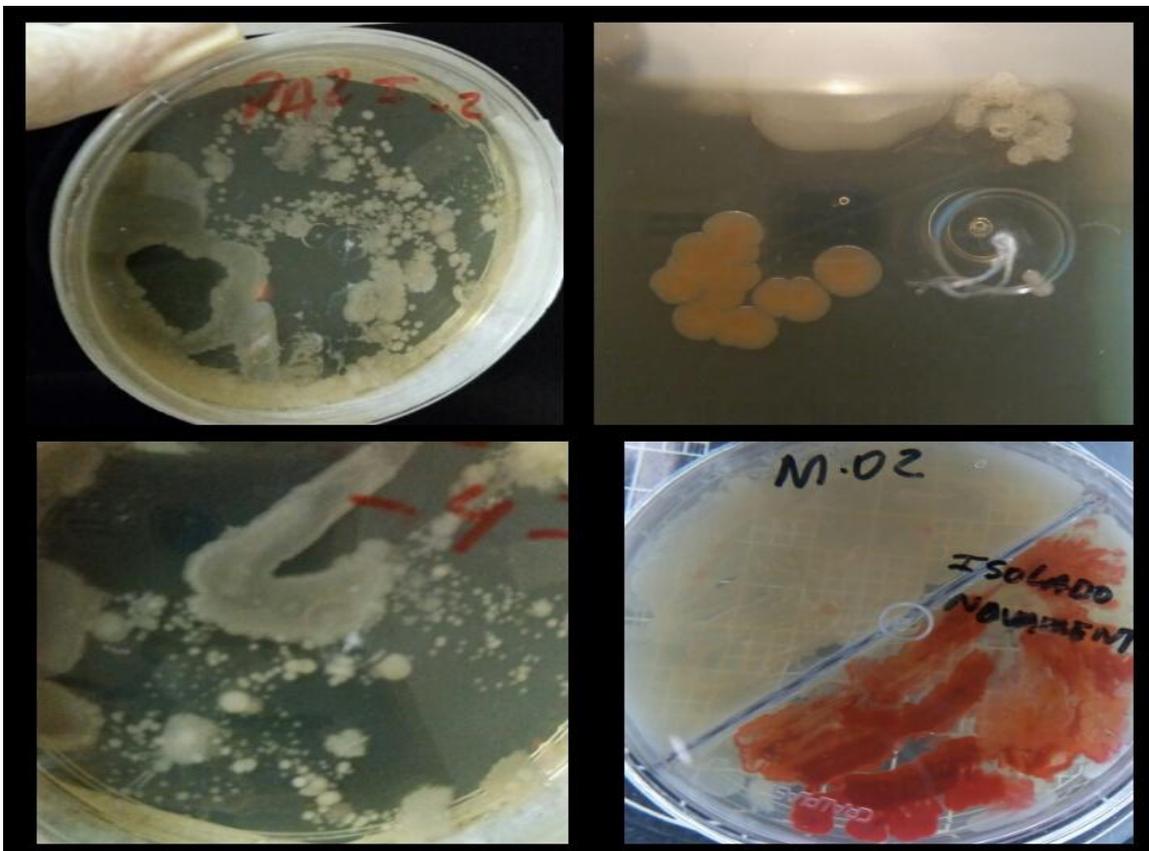


Figura 4: Morfotipos de isolados bacterianos crescidos em meio TSA. Fonte: Resultados da pesquisa.

Conforme as bactérias se alimentam do meio de cultura nutritivo em que se encontram elas se multiplicam. A partir de algumas horas começam a se amontoar podendo ser visíveis a olho nu. A esse conjunto formado dá-se o nome de colônias bacterianas e essas características, visíveis a olho nu, é o que chamamos de morfologia, e através disso identificamos previamente o microrganismo.

De acordo com Tortora (2003), o método da coloração de Gram consiste em diferenciar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O princípio da técnica está baseado na diferença de composição da parede de diferentes bactérias e na capacidade que elas apresentam de reter os corantes utilizados.

Historicamente tanto a coloração de Gram quanto as formas bacterianas foram descritas a partir do século XXIV, e com os avanços de microscopia; possibilitando a visualização da morfologia bacteriana. As bactérias Gram negativas (cor vermelha) e Gram positivas (cor roxa); suas formas (bacilos e/ou cocos) e quanto aos arranjos e esporulação. As colônias podem ser agrupadas de acordo com suas características macroscópicas, como o tamanho, a forma, a elevação, as bordas, a estrutura, o brilho, a cor e o aspecto. Para esse trabalho foram definidos morfotipos bacterianos do solo visualizados em microscopia sugerindo diversidade nos parques amostrados.

Foi observado que, tanto no Parque das Águas quanto no Parque Tia Nair, que são consideradas áreas com menor quantidade de mata nativa e maior área com vegetação exótica (tamanho das áreas e uso do local), apresentaram poucas bactérias do grupo das Gram positivas no período seco (percentual não significativo). Porém, no período chuvoso, estas mesmas áreas amostradas evidenciaram um percentual de 6% com grupos de Gram positivas (figura 5 e 6), sendo considerado, mesmo assim, uma quantidade baixa para os grupos bacterianos nativos do solo.

A maioria das bactérias do grupo das Gram negativas está relacionada a enterobactérias, ou seja, bactérias que tem seu habitat no intestino de animais de sangue quente. Classicamente, o indicador microbiológico mais utilizado tem sido, em termos práticos, o grupo dos coliformes. O termo coliforme engloba um amplo grupo de bactérias que vivem no trato digestivo de vertebrados, são aeróbias ou

facultativas, gram-negativas, não formadoras de esporos e capazes de fermentar lactose em 48 horas após a incubação a 35°C. Segundo essa definição, coliformes englobam os gêneros bacterianos *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* (Brock & Madigan, 1991, citado por Turco & Blume, 1999).

Nos parques amostrados há presença constante de animais silvestres como pacas, cutias e patos, além dos visitantes urbanos, ratos e humanos. Nos Parques Tia Nair e Parque das Águas são permitidos também pets (cães, gatos). Esses animais estão nos arredores e alguns dentro da água das lagoas, depositando excrementos e excreções. Os antigos lagos e nascentes naturais nos dois parques foram transformados em lagoas artificiais. No período da seca a água desses reservatórios é eventualmente utilizada para molhar os pontos amostrados. Segundo essas informações, podemos inferir que o percentual de bactérias Gram negativas encontradas pode estar relacionado ao impacto de uso dos locais.

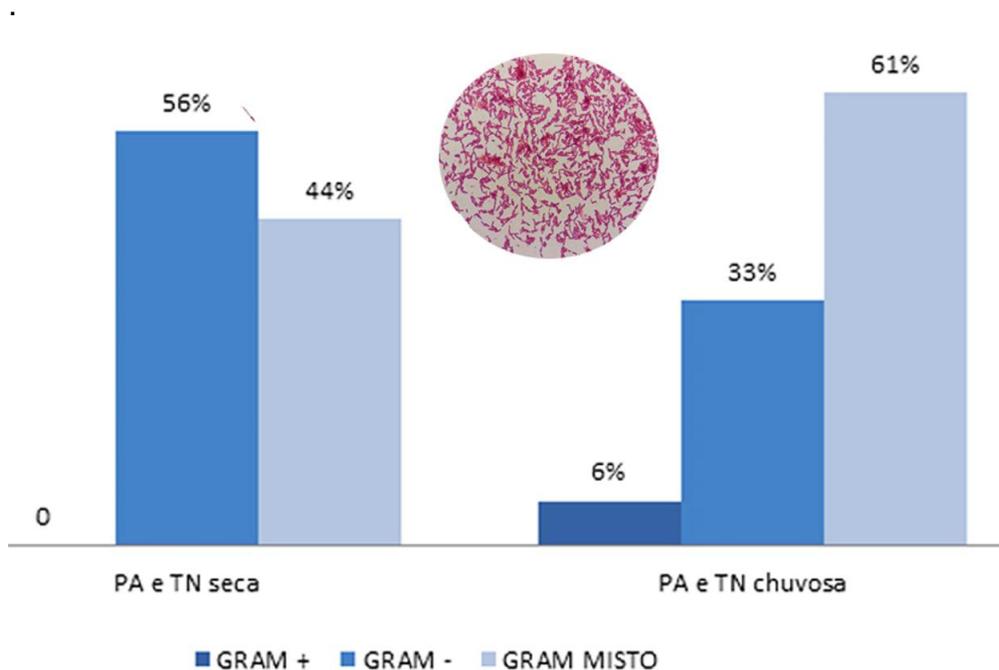


Figura 5: Gráfico evidenciando a diversidade de morfotipos bacterianos com coloração de Gram e sazonalidade e, imagem de bacilos Gram negativos visto em microscopia de campo claro. Aumento de 1000x. Fonte: Resultados da pesquisa.

Os parques Mãe Bonifácia e Massairo Okamura, que são parques com maior área de vegetação nativa, não demonstram em seus resultados que os períodos interferiram quanto á composição das bactérias dos distintos grupos, evidenciando

apenas um discreto aumento na estação chuvosa de Gram positivas e mistas (figura 5). Este resultado pode indicar que a vegetação nativa nesses dois parques mantém a estabilidade dos microrganismos nativos do solo e estes não se alteram significativamente, apesar da estiagem.

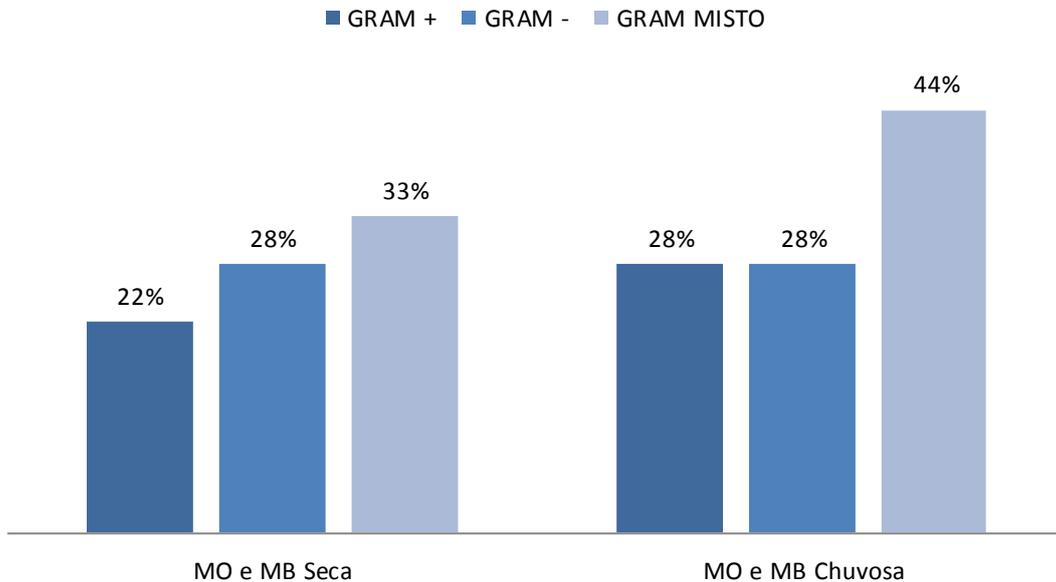


Figura 6: Comparativo entre os parques relacionando os períodos secos e chuvosos e os grupos de bactérias Gram positiva e Gram negativa. Fonte: Resultados da pesquisa.

As formas bacterianas de cocos apresentam-se ovais, arredondadas e achatadas; quando elas se reproduzem podem formar pares dando origem a arranjos. Foram encontrados nesta pesquisa: estreptococos, sarcina e bacilos. Segundo Kloepper (1997), estes se caracterizam por apresentar forma de bastonetes, aeróbias ou anaeróbias facultativas, com parede celular estruturada em multicamadas e formação de endósporos resistentes a diversos fatores abióticos, como calor, frio, condições extremas de pH, pesticidas, fertilizantes e ao tempo de estocagem.

Em relação às formas que as bactérias se apresentaram nos solos dos parques (TN e PA), os resultados apontam dados próximos no período chuvoso e seco com uma diferença pouco significativa, de 6% de bacilos, no período chuvoso. A maior diversidade das formas de bacilos e cocos nos dois períodos, demonstra característica de não dominância de apenas uma forma bacteriana. Quando isso ocorre, podemos inferir que a variação de formas é uma das características do que chamamos de diversidade (figura 7).

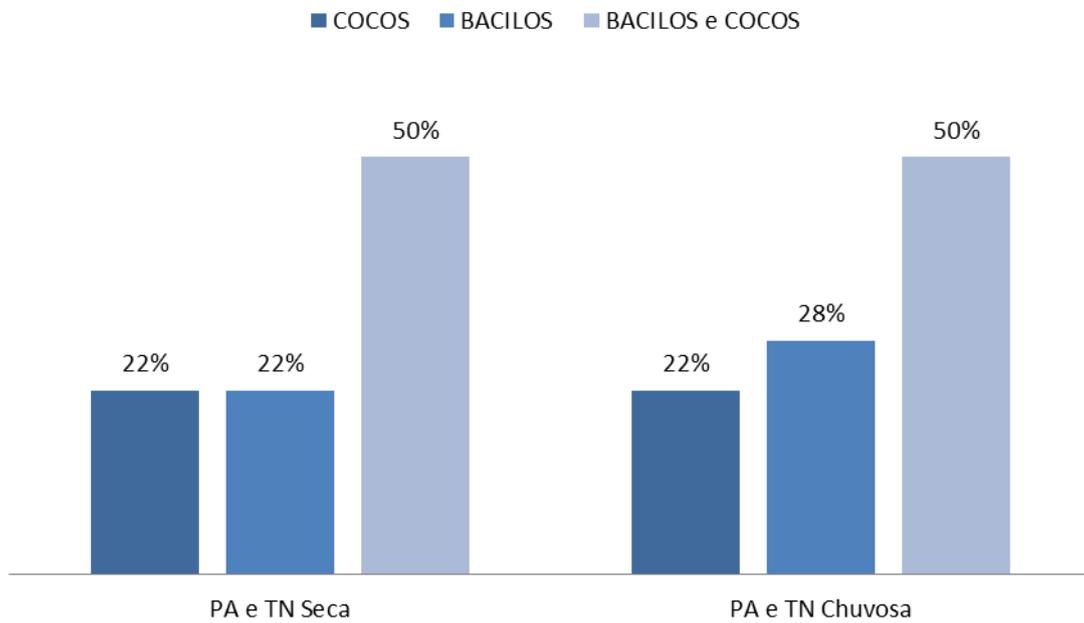


Figura 7: Comparativo entre os parques relacionando os períodos secos e chuvosos com as formas bacterianas. Fonte: Resultados da pesquisa.

Diante disso, os parques Mãe Bonifácia e Massairo Okamura demonstraram maior quantidade de bacilos na estação seca com 55,55%, e no período chuvoso um percentual de 22,20%. Bactérias do tipo cocos foram observadas apenas no período chuvoso, tendo assim a morfologia mista, cocos e bacilos, em maior quantidade nesta sazonalidade (figura 8).

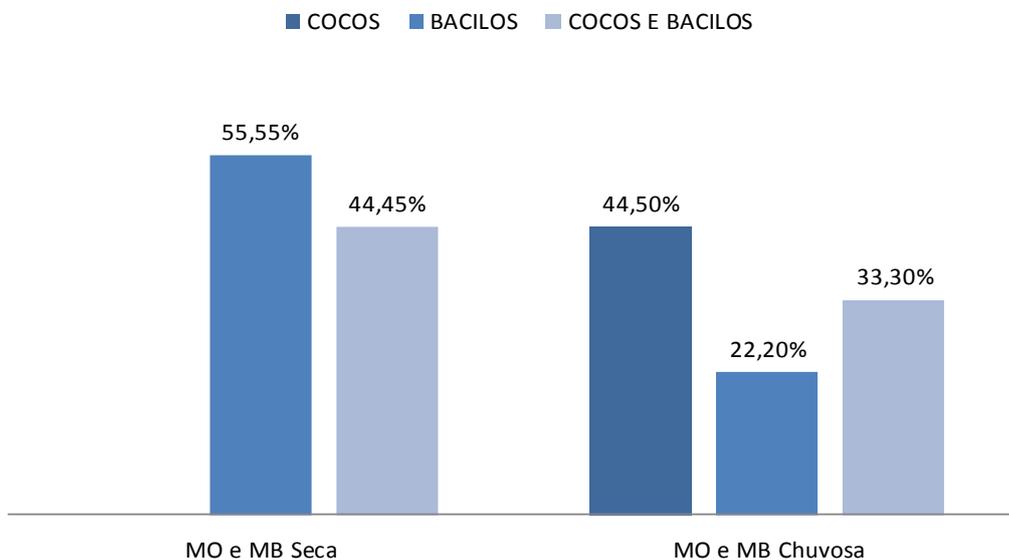


Figura 8: Variável relacionada á forma bacteriana e os períodos secos e chuvosos dos Parques com maior área de vegetação nativa conservada. Fonte: Resultados da pesquisa.

O estresse fisiológico imposto pela seca pode reduzir a diversidade microbiana total, interferindo também em seus morfotipos (SCHIMEL et al., 1999). As variações sazonais de umidade podem afetar as comunidades e a diversidade microbiana do solo, bem como suas atividades. O estresse hídrico pode induzir prejuízos para os microrganismos. Segundo Billi et al., (2002), a água é requerida para estabilizar o microambiente celular que influencia as propriedades fisiológicas, na regulação de proteínas, expressão gênica, conservação da membrana, estrutura e função celular.

Observou-se poucos arranjos referentes á estação seca, 13,88%. A esporulação foi observada em 86,11%, demonstrando que as bactérias em sua grande maioria possuem esporos, prevalecendo esporulação mista. Quando se diz que a maior porcentagem gerada foi mista, significa compreender que existem vários isolados observados na mesma lâmina, onde foram evidenciadas as duas formas de bactérias mais prováveis de se encontrar no solo.

Os bacilos apresentam apenas um plano de divisão celular, a partir disso formam arranjos. Estes arranjos foram observados nas lâminas de microscopia para essa pesquisa os denominados estreptobacilos, (Figura 9).

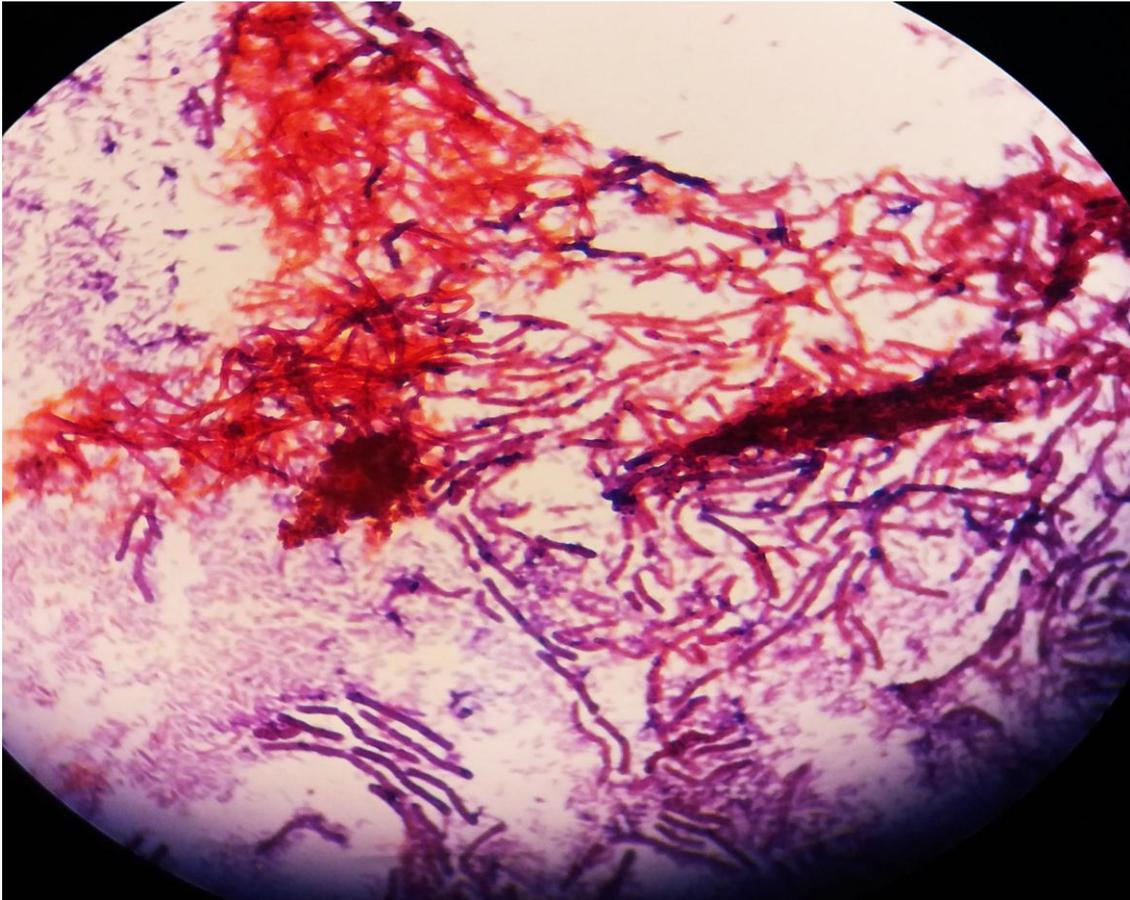


Figura 9: Representação em microscopia de campo claro dos dois grandes grupos bacterianos. Gram positiva (cor roxa) e Gram negativa na forma de bastonetes (cor vermelha), demonstrando que em seu plano de divisão celular obteve arranjos estreptobacilos. Fonte: Resultado da pesquisa.

A maior diversidade de arranjos observada pela microscopia foi na estação chuvosa (Figura 10). Desse modo verifica-se que a pluviosidade tem participação fundamental no desenvolvimento bacteriano no solo, provavelmente por gerar um microambiente favorável a esses microrganismos, podendo inclusive propiciar novos arranjos genômicos e gênico entre estes tendo em vista que; segundo Ledeborg e Tatum (1946), conjugação bacteriana é o processo sexual de transferência de genes de uma bactéria doadora para uma receptora. As bactérias podem trocar material genético e formar proles recombinantes.

Conforme Catelan e Vidor (1990), as diferentes condições climáticas ocasionadas pelas estações do ano alteram as relações que ocorrem entre o solo e a cobertura vegetal, especialmente nas regiões subtropicais. Sendo assim, a atividade microbiana do solo também apresentará flutuação intra-anual, principalmente nos primeiros centímetros, onde a umidade e a temperatura podem variar com maior frequência.

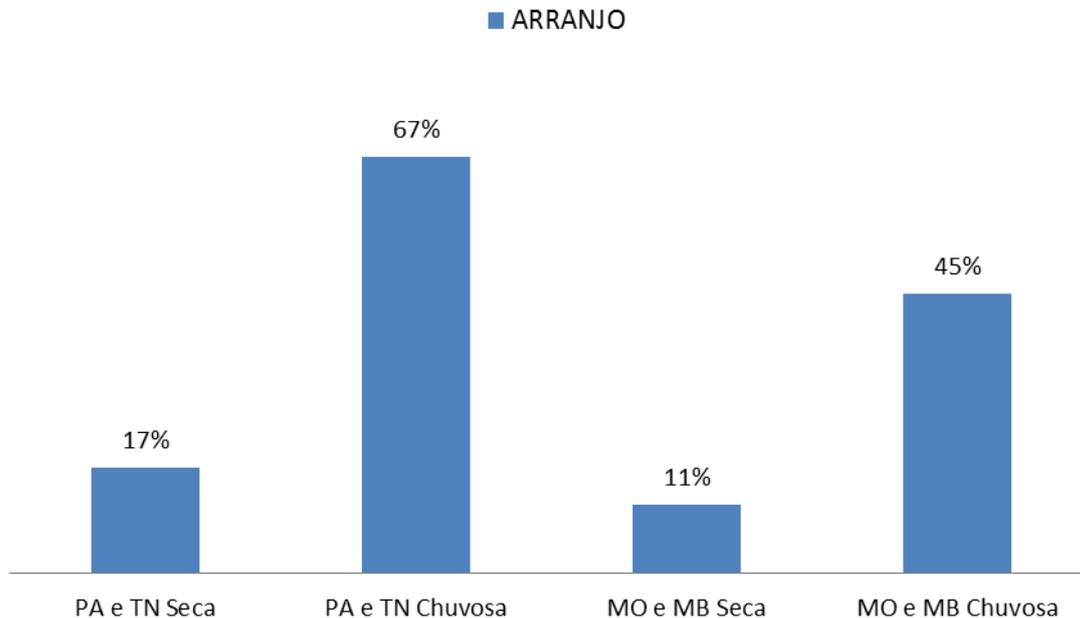


Figura 10: Comparativo entre os parques relacionando os períodos secos e chuvosos e os arranjos morfológicos. Fonte: Resultados da pesquisa.

Os isolados foram submetidos a uma triagem de modo a serem separados por características morfotintoriais como: parede celular (Gram positivo e Gram negativo); formas (bacilo e cocos); arranjos e esporulação, após uma contagem geral pelo método de análise combinatória da quantidade de morfotipos que cada parque poderia conter, foram obtidos os resultados expostos na Figura 11.

O parque Tia Nair apresentou maior quantidade de morfotipos na estação da seca. Isto pode ser justificado pela interferência antrópica no local, como processos de irrigação e o fluxo de pessoas e animais, os quais podem favorecer um grupo bacteriano em detrimento a outro; além do tamanho reduzido da área, que pode sofrer impactos bruscos com as mudanças climáticas. O segundo parque, o Parque das Águas, se inferiu não manter o equilíbrio da microbiota nativa, por ser o mais recente entre os parques pesquisados, e parte da microbiota alóctone, através da inserção de solo tipo “terra preta” para plantio de gramíneas, palmeiras e outras plantas exóticas.

Em relação aos parques Mãe Bonifácia e Massairo Okamura, seus morfotipos estão em equilíbrio, fato esse que justifica sua conservação pela manutenção da maioria da vegetação nativa e pelo tempo de estabilização das áreas; além da proibição de acesso de animais exóticos e domésticos.

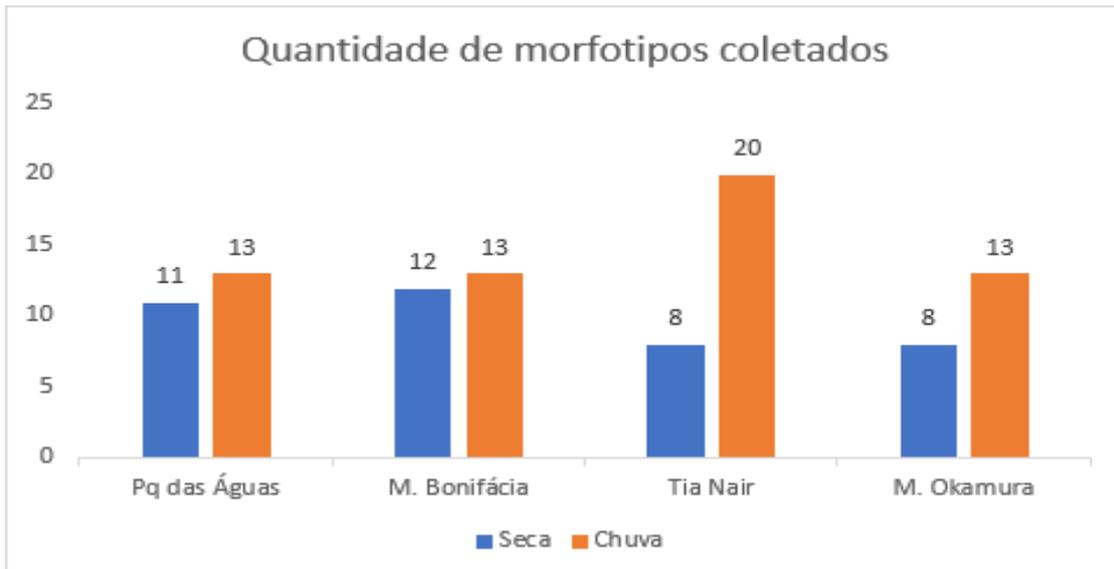


Figura 11: Quantidade geral de morfotipos por parques visualizados em microscopia de campo claro. Fonte: Resultados da pesquisa.

4.2 TÉCNICAS MOLECULARES

As técnicas moleculares vêm sendo utilizadas como um complemento dos resultados dos métodos convencionais. A introdução da PCR (amplificação) e corrida eletroforética em diagnóstico microbiano estabeleceu uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura (Marlology et al.; 2003). Esta técnica apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, como maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade e precisão (Bush e Nitschko, 1999). Talvez o maior ganho das técnicas moleculares em relação às convencionais esteja na possibilidade de se trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura diversos (MENDES et al., *apud* WARD, 1990).

Segundo Destro (1995), avanços de biologia molecular propiciaram várias técnicas de identificação genética com resultados mais confiáveis e rápidos. Os resultados aqui obtidos através da amplificação dos genes 16S rDNA e 16S Aer, (figura 12) confirmam que as técnicas moleculares para identificação de organismos são mais conclusivas que as convencionais. Utilizando a técnica de PCR e sequenciando o DNA amplificado, podemos afirmar com maior confiabilidade sobre o gênero e/ou espécie. Isto é possível utilizando-se de sequências amplificadas via *primers* espécie-específico ou copiando e colando as sequências obtidas e comparando a outras sequências depositadas em bancos mundiais de dados

genéticos, como no BLAST, que foi a metodologia escolhida nesse trabalho. A partir do sequenciamento, também se pode analisar o grau de diferenciação entre os indivíduos e seus congêneres, utilizando diversos programas de bioinformática.

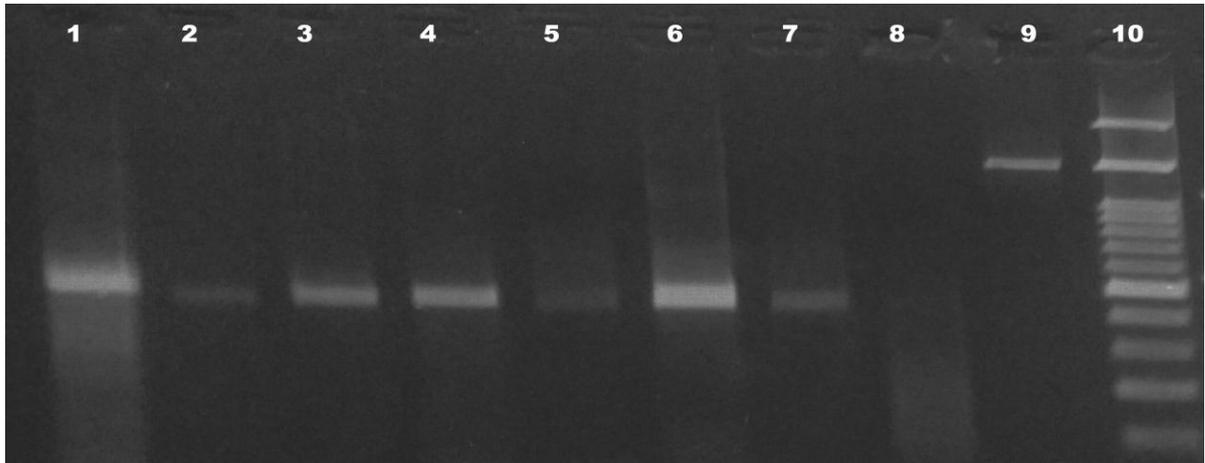


Figura 12: Gel de eletroforese evidenciando as regiões amplificadas de rDNA 16S, a partir da PCR, de 1 a 7, com bandas de 400pb . No poço 9 do gel, a banda 16S Aer com cerca de 787pb. No número 10 o marcador comercial (Ladder). Fonte: Resultados da pesquisa.

O sequenciamento das vinte e duas amostras que amplificaram com o uso dos *primers* neste trabalho, possibilitou a comparação destas com dados já existentes, e agruparam as amostras em sete gêneros: *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, *Cedecea*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Salmonella*, com alto grau de identidade genética para espécies, variável de uma amostra para outra, entre 79 e 99% (figura 13). As barras azuis referem-se a identidade genética que vem representada pelo percentual (probabilidade) daquela determinada amostra ser do gênero/espécie existente no banco de dados genômicos.

Gênero Bacteriano e Identidade Genética

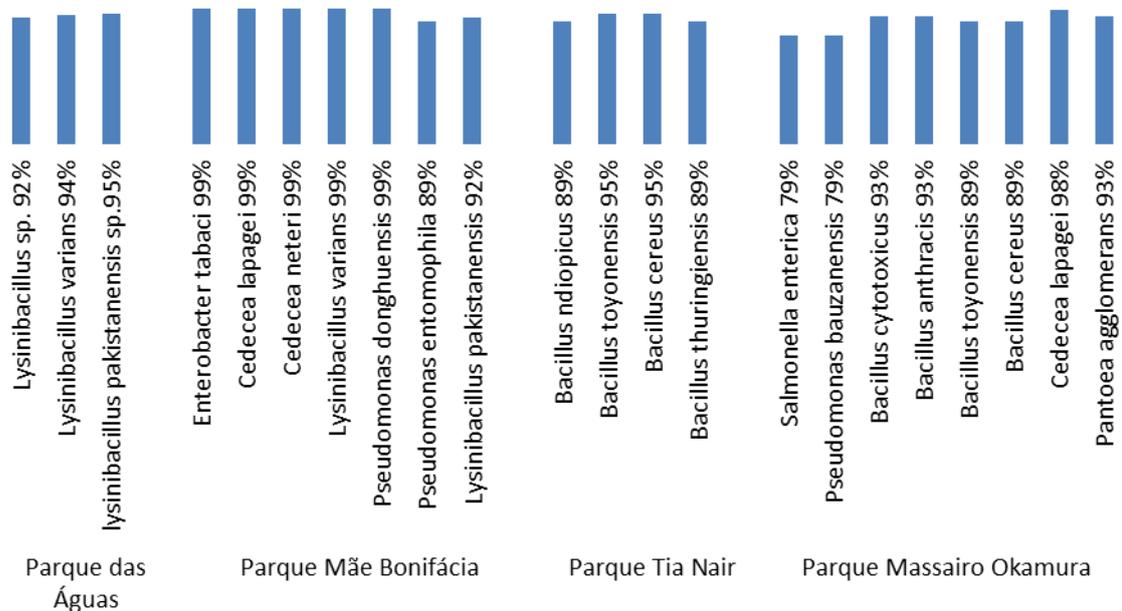


Figura 13: Identificação de gêneros/espécies de bactérias, via BLAST, após sequenciamento dos genes 16S rDNA e 16S Aer. Fonte: Resultados da pesquisa.

Comparar alternativas de análise e distintas metodologias em laboratório demanda de tempo, esforço e dedicação, porém, é de extrema relevância para a objetividade e determinação de trabalhos futuros. Diante da confirmação das hipóteses deste trabalho, pretende-se ampliar o período de amostragem e a utilização de outros *primers* para identificar espécies de microrganismos de amostras ambientais.

Além disso, este trabalho sugere que, o equilíbrio e a diversidade da microbiota dos solos dos parques de Cuiabá, com maior área e menor grau de alteração da vegetação na implantação dos mesmos, podem ser previstos e mantidos na criação desses espaços urbanos, pelos órgãos e responsáveis.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das análises aqui apresentadas, em relação às estações secas e chuvosas, fica evidenciada que na estação chuvosa foi maior a quantidade de morfotipos entre todos os parques. A esporulação foi a variável que mais se repetiu entre as estações com um percentual de 91,66% após as chuvas e 86,11% na estação seca. Como os esporos são estruturas que as bactérias desenvolvem em situações de estresse, os dados indicam que independente da estação os microrganismos residentes nesses parques estão vivendo em condições adversas.

Dentre os arranjos, mais da metade 55,55% das áreas amostradas apresentaram *Streptococos*, *Streptobacilos* ou *Sarcina* e por vezes mais de um arranjo na mesma visualização, confirmando que na estação das chuvas a reprodução das bactérias e seus morfotipos são significativamente maiores.

Em relação à diversidade microbiana entre os parques e a influência antrópica no uso do local, observou-se que os parques com maior grau de alteração apresentaram menor equilíbrio e diversidade de sua microbiota, confirmando que a diversidade bacteriana dos solos dos parques urbanos de Cuiabá-MT está positivamente relacionada ao nível de preservação dessas unidades de conservação.

Sendo assim, ficam evidentes que os métodos convencionais nos confirmam as características fenotípicas de determinado organismo, porém, não foram suficientes para afirmar que os parques Mãe Bonifácia e Massairo Okamura apresentaram maior diversidade microbiana que os parques Tia Nair e Parque das Águas. Porém, a especificidade e confiabilidade das análises moleculares, possibilitaram a identificação de mais gêneros e espécies de bactérias nos parques que conservam sua vegetação nativa. Portanto, se propõe que os futuros projetos de parques urbanos levem em consideração a vegetação e a microbiota local.

6. REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M. V. **Caracterização da diversidade microbiológica do solo do cerrado (DGGE)**. 2011. Monografia (Pós graduação em microbiologia agrícola). UFLA, MG, 2011.
- ASCHER, J. **Journal of microbiology biotechnology**. Oxford, v. 26, n. 9, p. 1721, Sept. 2010.
- ATLAS, R.M. Use of microbial diversity measurements to assess environmental stresses. In: KLUG, M.J.; REDDY, C.A. **Current perspectives in microbial ecology**. Washington: American Society for Microbiology, 1984. p. 540-545.
- BILLI, D.; POTTS, M. (2002) Life and death of dried prokaryotes. **Research in Microbiology**. 153: 7-12.
- BROOKES, P.C.; MCGRATH, S.P. Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. **Journal of Soil Science**, v.35, p.341-346, 1984.
- BUSH, U.; NITSCHKO, H. Methodos for the differentiation of microorganisms. **J. Cromatography**, Amsterdam, v. 722, p. 263-278, 1999.
- CATELAN, A. J.; VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função de variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 133-142, 1990.
- DESTRO, M.T. **Listeria monocytogenes em Camarão (Penaeus brasiliensis): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescados**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade de São Paulo, SP, 1995.
- DICK, R. P. Soil enzyme assays as indicators of soil quality. In: DORAN, J. W. L.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. (Eds.). Defining soil quality for a sustainable enviroment. Madison: **Anais...** Soil Science Society of America, 1994. p. 107-124.
- ELSAS, J.D.VAN; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. **Modern soil microbiology**. Marcel Dekker, New York. 1997. 682p.
- EMBRAPA, 2002. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Disponível em <http://www.cpa.embrapa.br>>. Acesso em 10/Maio/2017.
- GRIFFITHS. **Introdução a genética**. 8º ed. Guanabara Koogan, 2006. 764 p.
- GUARIM NETO, G. **Parques Urbanos de Cuiabá MT**. Cuiabá-MT: Entrelinhas: EdUFMT,1991.

HUNGRIA, M; VARGAS, B. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S RNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, n5, Viçosa, set. oct. 2003.

KLIASS, Rosa Grena. Os parques urbanos de São Paulo. **Revista USP**, n.23, p.20-33, 1993.

KIOEPER, J. W. Current status and future trends in biological research and development in the U.S. *in*: International Symposium on clean agriculture. **Anais...** Japan, vol. 1, p. 49-52, 1997.

LEDERBERG, J., TATUM, E. L. Gene recombinante in *Escherichia coli*. **Nature.**, v 158, p. 558-565, out. 1946.

MAITELLI, G.T. Intensidade da ilha de calor em Mato Grosso. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE METEOROLOGIA, 13, Fortaleza/ CE, 2004. **Anais...** Fortaleza, SBMET, p. 69-82.

MANFIO, P. G. **Microbiota**. 2003. Projeto (Avaliação do Estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil). UNICAMP, Campinas, 2003.

MAPA. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. 2002. Documentos 51 EMBRAPA. Planaltina, DF. 2002.

MARLOLONY, B. Et al.; Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. *Int. J. Food microbiol.*, Amsterdam, v. 83, n.1, p. 29-48, 2003.

MARTIN COBA. **Diversidade de bactérias cultiváveis do solo do cerrado brasileiro**. 2012. Dissertação. UFLA, Lavras-MG, 2012.

MELAZZO, C.A; COLESANTI, D.E. O parque urbano no contexto da urbanização. **Revista FCT UNESP**, p.06-09, 2003.

MENDES, I. C; REIS-JUNIOR, F. B; HUNGRIA, M; FERNANDES, M. F; CHAER, G. M; MERCANTE, F. M; ZILLI, J. E. Embrapa: *In*: Microbiologia do solo e sustentabilidade de sistemas agrícolas. Planaltina, DF p. 219, 2011.

MESQUITA, A.V. **Caracterização da atividade microbiológica do solo do cerrado**. 2011. *Dissertação* (Mestrado em Genética). UFLA, Lavras-MG, 2011.

MMA-Ministério do Meio Ambiente, 2010. **Microrganismos**. Disponível em http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/arquivos/Aval_Conhec_Cap2.pdf. Acesso em 05/Maio/2017.

MMA-Ministério do Meio Ambiente, 2012. Áreas verdes urbanas. Disponível em <http://www.mma.gov.br/informma/itemlist/category/61-areas-verdes-urbanas>. Acesso em 03/Maio/2017.

PEDRON, A.F; DALMOLIN, D. S. R; AZEVEDO, C.A; KALMINSK, J. Solos urbanos. **Scielo Revista Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1647-1653, set-out, 2004.

RIBEIRO G. D; CAETANO, P. M; MEGLHIORATTI. *In*: Evento supervisionado de Ciência e Biologia II, 2016, Paraná. **Anais...** A construção conceitual sobre fungos e decomposição em aulas teóricas: Práticas no ensino médio. Paraná: UNIOESTE, 2016. 6 p.

RUSSEL, E. W. **Soil conditions and plant growth**. Londres: Longman, 1973. 849p.

SCHIMEL, J. P., GULLEDGE, J. M., CLEIN-CURLEY, J. S., LINDSTROM, J. E., BRADDOCK, J. F. (1999). **Moisture effects on microbial activity and community structure in decomposing birch litter in the Alaskan taiga**. Soil Biological Biochemical. 31: 831-838.

SEELEY, H. M. Cultura de Microrganismos. 1991. *In*: DIFCO Manual: pp. 4-16.

SILVA, N., JUNQUEIRA, C., SILVEIRA, A. **Manual de métodos de análises microbiológicas**. São Paulo- SP: Blucher, 2010; 2^a ed. 624 p.

THOMPSON & THOMPSON. **Genética médica**. São Paulo- SP: Elsevier, 2016. 560 p.

TORTORA, G. J. FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2003. 894 p.

TURCO, R. F.; BLUME, E. Indicators of soil quality. *In*: SIQUEIRA, J. O; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. G. R.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Org.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS ; Lavras: UFLA/DCS, 1999. p. 529-549.

VILA NOVA, S. R. F e GUARIM V. L. M. S. **Fragmentos de habitat em Cuiabá MT**. Cuiabá-MT : Entrelinhas: EdUFMT, 2008.

ANEXOS

QUADRO 1 - Colônias de bactérias re-isoladas para visualização em microscopia em campo claro, coleta da estação seca. Fonte: Resultados da pesquisa.

ISOLADOS	GRAM + OU -	FORMAS	ARRANJOS	ESPORULAÇÃO
PA1 10 ⁻²	(-)	Bacilos		Esporulada
PA1 10 ⁻³	(-)	Bacilos e cocos		Esporulada
PA1 10 ⁻⁴	(-)	Bacilos e cocos		Esporulada
PA2 10 ⁻²	Misto	Bacilos		Esporulada mista
PA2 10 ⁻³	Misto	Bacilos	Estreptobacilos	Esporulada
PA2 10 ⁻⁴	(-)	Bacilos	Estreptobacilos	Esporulada mista
PA3 10 ⁻²	(-)	Bacilos	Estreptococos	Esporulada
PA3 10 ⁻³	(-)	Bacilos e cocos		Esporulada
PA3 10 ⁻⁴	Misto	Bacilos e cocos		Esporulada mista
MB1 10 ⁻²	(-)	Bacilos e cocos		Esporulada mista
MB1 10 ⁻³	(-)	Bacilos		Esporulada
MB1 10 ⁻⁴	(+)	Bacilos		Esporulada
MB2 10 ⁻²	(-)	Bacilos		
MB2 10 ⁻³	(+)	Bacilos		
MB2 10 ⁻⁴	Misto	Bacilos	Estreptococos	Esporulada mista
MB3 10 ⁻²	Misto	Bacilos e cocos		Esporulada mista
MB3 10 ⁻³	Misto	Bacilos e cocos		Esporulada mista
MB3 10 ⁻⁴	(-)	Bacilos	Estreptococos	Esporulada
TN1 10 ⁻²	Misto	Bacilos e cocos		Esporulada mista
TN1 10 ⁻³	Misto	Cocos		
TN1 10 ⁻⁴	(-)	Bacilos e cocos		Esporulada
TN2 10 ⁻²	Misto	Bacilos e cocos		
TN2 10 ⁻³	(-)	Cocos		Esporulada
TN2 10 ⁻⁴	(-)	Cocos		Esporulada mista
TN3 10 ⁻²	Misto	Bacilos e cocos		
TN3 10 ⁻³	Misto	Cocos		Esporulada
TN3 10 ⁻⁴	(-)	Bacilos e cocos		Esporulada mista
MO1 10 ⁻²	Misto	Bacilos		Esporulada mista
MO1 10 ⁻³	(+)	Bacilos		Esporulada mista
MO1 10 ⁻⁴	Misto	Bacilos e cocos		Esporulada mista
MO2 10 ⁻²	(+)	Cocos		Esporulada mista
MO2 10 ⁻³	(-)	Bacilos		Esporulada mista
MO2 10 ⁻⁴	(+)	Bacilos		Esporulada mista
MO3 10 ⁻²	Misto	Bacilos e cocos		Esporulada mista
MO3 10 ⁻³	(+)	Bacilos e cocos		Esporulada mista
MO3 10 ⁻⁴	(+)	Bacilos e cocos		Esporulada mista

Quadro 2 - Colônias de bactérias re-isoladas para visualização em microscopia em campo claro, coleta da estação chuvosa. Fonte: Resultados da pesquisa.

ISOLADOS	GRAM + OU -	FORMAS	ARRANJOS	ESPORULAÇÃO
PA1 10 ⁻²	Misto	Bacilos e cocos		Esporulada mista
PA1 10 ⁻³	(+)	Cocos		Esporulada mista
PA1 10 ⁻⁴	(-)	Cocos	Sarcina	
PA2 10 ⁻²	Misto	Bacilos	Estreptobacilos	Esporulada mista
PA2 10 ⁻³	(-)	Cocos	Sarcina	
PA2 10 ⁻⁴	Misto	Bacilos		Esporulada mista
PA3 10 ⁻²	Misto	Bacilos e cocos	Estreptococos	Esporulada mista
PA3 10 ⁻³	(-)	Bacilos	Estreptobacilos	Esporulada mista
PA3 10 ⁻⁴	(-)	Bacilos	Estreptobacilos	Esporulada mista
MB1 10 ⁻²	Misto	Bacilos e cocos		Esporulada mista
MB1 10 ⁻³	(-)	Bacilos	Estreptobacilos	Esporulada
MB1 10 ⁻⁴	(-)	Bacilos e cocos		Esporulada mista
MB2 10 ⁻²	Misto	Bacilos	Estreptobacilos	Esporulada
MB2 10 ⁻³	(-)	Cocos	Sarcina	Esporulada
MB2 10 ⁻⁴	(-)	Bacilos e cocos		Esporulada mista
MB3 10 ⁻²	(-)	Bacilos	Estreptococos	Esporulada mista
MB3 10 ⁻³	Misto	Bacilos e cocos	Estreptococos	Esporulada mista
MB3 10 ⁻⁴	Misto	Bacilos		Esporulada mista
TN1 10 ⁻²	(-)	Cocos	Estreptococos e Sarcina	Esporulada mista
TN1 10 ⁻³	Misto	Bacilos e cocos	Estreptococos	Esporulada mista
TN1 10 ⁻⁴	Misto	Bacilos e cocos	Sarcina	Esporulada mista
TN2 10 ⁻²	Misto	Bacilos e cocos	Estreptococos	Esporulada mista
TN2 10 ⁻³	Misto	Bacilos e cocos		Esporulada mista
TN2 10 ⁻⁴	Misto	Bacilos e cocos	Estreptobacilos	Esporulada mista
TN3 10 ⁻²	Misto	Bacilos e cocos		Esporulada mista
TN3 10 ⁻³	Misto	Bacilos		Esporulada
TN3 10 ⁻⁴	(-)	Bacilos e cocos	Estreptococos e Sarcina	Esporulada mista
MO1 10 ⁻²	(+)	Bacilos		Esporulada mista
MO1 10 ⁻³	(+)	Cocos	Estreptococos	
MO1 10 ⁻⁴	Misto	Bacilos	Estreptobacilos	Esporulada mista
MO2 10 ⁻²	(+)	Cocos		Esporulada mista
MO2 10 ⁻³	(+)	Bacilos e cocos	Estreptobacilos	Esporulada mista
MO2 10 ⁻⁴	(+)	Bacilos		Esporulada mista
MO3 10 ⁻²	Misto	Bacilos		Esporulada mista
MO3 10 ⁻³	Misto	Bacilos e cocos		Esporulada mista
MO3 10 ⁻⁴	Misto	Cocos		Esporulada mista



Figura 14: Cultivo de bactérias em meio TSA. Fonte: Resultados da pesquisa.

segua x NCBI Blast:Nucleotide Se x

Seguro | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Sites Sugeridos Sigepa Entrada (233) - sandr Campus Cuiabá - Bel Plataforma Sucupira A Beautiful Mind (Um TESTES DE CITOLOGIA User Application | Us My NCBI - Home

Description	score	score	cover	value	ident	Accession
<input type="checkbox"/> Pseudomonas donghuensis strain HYS 16S ribosomal RNA, complete sequence	499	499	100%	4e-141	88%	NR_136501.2
<input type="checkbox"/> Pseudomonas alkylphenolica strain KL28 16S ribosomal RNA, partial sequence	499	499	100%	4e-141	88%	NR_145644.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas quariconensis strain PCAVU11 16S ribosomal RNA, partial sequence	499	499	100%	4e-141	88%	NR_135703.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas plecoqlossicida strain NBRC 103162 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	499	499	100%	4e-141	88%	NR_114226.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas cremoricolorata strain NBRC 16634 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	499	499	100%	4e-141	88%	NR_113855.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas parafulva strain NBRC 16636 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	499	499	100%	4e-141	88%	NR_113856.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas taiwanensis strain BCRC 17751 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	499	499	100%	4e-141	88%	NR_116172.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas cremoricolorata strain IAM 1541 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	499	499	100%	4e-141	88%	NR_040860.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas parafulva strain AJ 2129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	499	499	100%	4e-141	88%	NR_040859.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas parafulva strain AJ 2129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	499	499	100%	4e-141	88%	NR_104278.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain ICMP 2758 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	499	499	100%	4e-141	88%	NR_114794.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas plecoqlossicida strain FPC951 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	499	499	100%	4e-141	88%	NR_024662.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain NBRC 14164 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	496	496	100%	5e-140	88%	NR_113651.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain ATCC 12633 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	496	496	100%	5e-140	88%	NR_114479.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas entomophila strain L48 16S ribosomal RNA, partial sequence	494	494	100%	2e-139	88%	NR_102854.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas soli strain F-279,208 16S ribosomal RNA, partial sequence	494	494	100%	2e-139	88%	NR_134794.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas montellii strain NBRC 103158 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	494	494	100%	2e-139	88%	NR_114224.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas mosselii strain CFML 90-83 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	494	494	100%	2e-139	88%	NR_024924.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas japonica strain NBRC 103040 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	494	494	100%	2e-139	88%	NR_040992.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas entomophila strain L48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	494	494	100%	2e-139	88%	NR_115336.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas vranovensis strain 2B2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	494	494	100%	2e-139	88%	NR_043313.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas montellii strain CIP 104883 16S ribosomal RNA, partial sequence	494	494	100%	2e-139	88%	NR_112073.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas montellii strain CIP 104883 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	494	494	100%	2e-139	88%	NR_024910.1

Figura 15: Print de uma das seqüências de PCR, após copiadas e coladas no Blast. Fonte: Resultados da pesquisa.

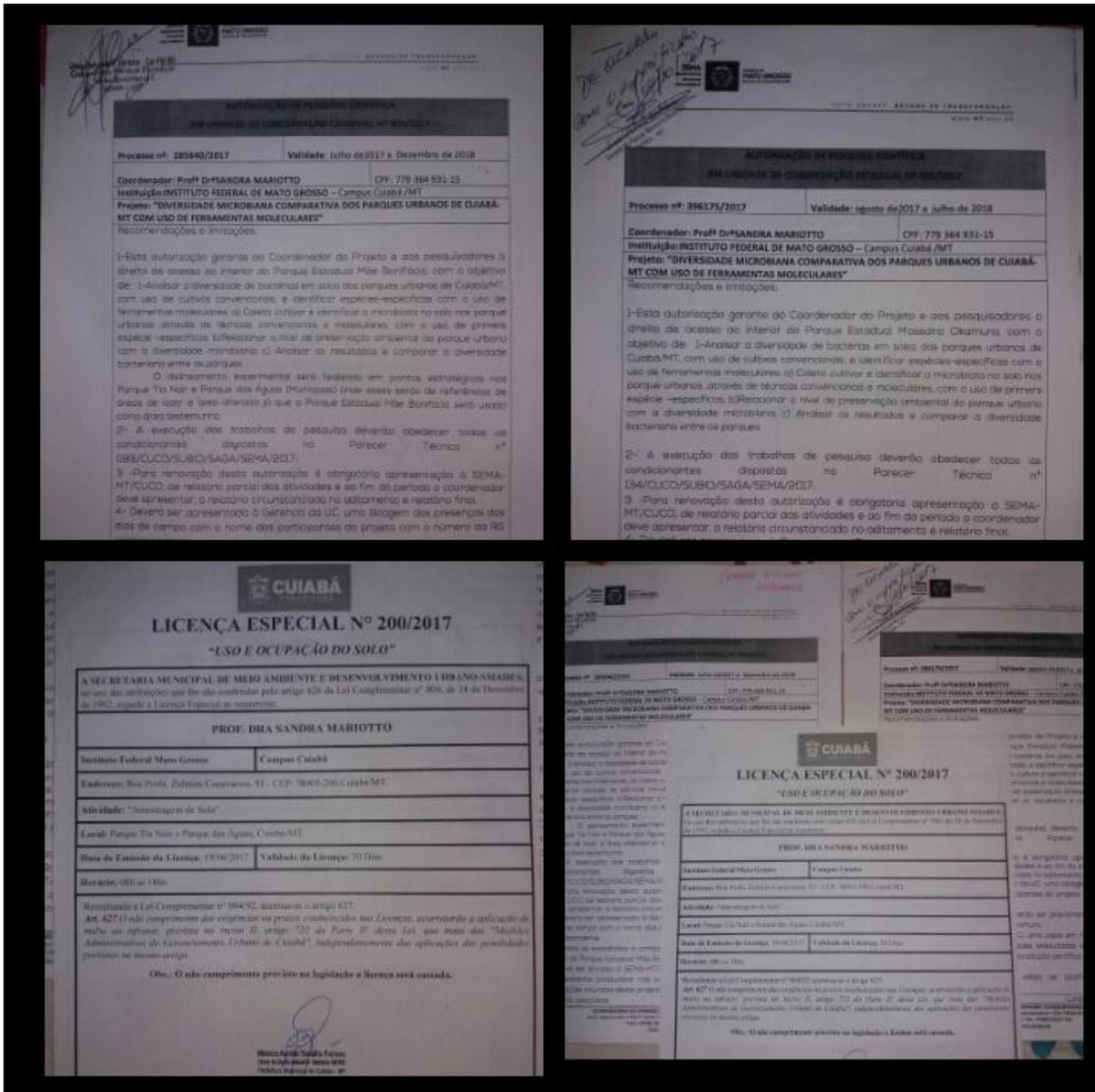


Figura 16: Licenças ambientais. Fonte: Resultados da Pesquisa.