

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE COMUNIDADES BACTERIANAS DE
SOLO POR SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA**

Érico Leandro da Silveira

Orientadora Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves

Co –orientadora Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

**Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Microbiologia –
Área de Concentração Microbiologia.**

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Abril de 2004

Silveira, Érico Leandro da
S587i Identificação de comunidades bacterianas de solo por
seqüenciamento do gene 16S rRNA/ Érico Leandro da Silveira –
Jaboticabal, 2004
ix, 83f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2004

Orientadora: Lúcia Maria Carareto Alves

Banca examinadora: Janete Aparecida Desiderio Sena e Uderlei
Doniseti Silveira Covissi

Bibliografia

1. Diversidade microbiana. 2. Ecologia microbiana. 3.
Metagenoma I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias.

CDU 631.461

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Érico Leandro da Silveira – Nascido em 20 de Janeiro de 1976, no município de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, concluiu a graduação em Ciências Biológicas (Bacharel e Licenciatura Plena), nas Faculdades Integradas Rio Pretense no município de São José do Rio Preto em 22 de Dezembro de 1997.

“Se eu fui capaz de ver um pouco mais adiante do que outros homens é porque eu montei nos ombros de gigantes.”

Isaac Newton

Aos meus pais

Gervásio da Silveira e Irene Maria Mastelari da Silveira

Que ensinaram a importância do estudo,

Por darem amor, apoio e compreensão,

Pelo esforço e trabalho que possibilitaram o estudo

Pela educação, lições de vida e moral

Aos meus irmãos

Wellington Ricardo da Silveira

Graziele M. da Silveira (In memorium)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves, com quem muito aprendi, pela orientação, pela amizade e pela oportunidade de crescimento profissional.

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, a quem muito admiro pela competência profissional e genialidade, agradeço pela co-orientação e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Aos professores Dr. Manoel Victor Franco Lemos e a Dra. Maria Inês T. Ferro, pelas sugestões no Exame de Qualificação, as quais contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos meus amigos, que foram mais que irmãos Irlan Leite de Abreu, Luciano T. Kishi, Rodrigo Matheus Pereira, Fernando César Ferreira, Denilson César Scaquitto que me ajudaram a superar problemas pessoais que me deram todo o apoio para terminar esta etapa da minha vida.

Aos meus amigos de República Rhuanito, Luiz Guilherme, Rodrigo, Rogério, Edvan, Fernando por terem me suportado todo esse tempo e pela amizade.

Aos professores da Graduação pelos ensinamentos transmitidos e conselhos.

Aos meus amigos de Graduação que me deram apoio todo esse tempo.

Aos meus amigos da equipe metagenômica do LBMP que ajudaram, em muito, para finalização deste trabalho.

A todos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) e Laboratório de Genética de Bactérias (LGB), **meus grandes amigos**, que direta ou indiretamente, me ajudaram neste trabalho e com os quais tive o privilégio de conviver, trocando experiências acadêmico-profissionais e, principalmente, usufruindo o verdadeiro sentido da palavra amizade.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Tecnologia pelo convívio.

Aos meus amigos Edson(tio) e Renato(Maluta) da Medicina Veterinária.

Aos meus pais Gervásio da Silveira e Irene M. Mastelari da Silveira, e meu irmão pelo amor, dedicação.

A Capes pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
I. INTRODUÇÃO	01
II. REVISÃO DE LITERATURA	03
II.1 Os microrganismos nos ecossistemas	03
II.2 Análises tradicionais e abordagem metagenômicas	06
II.3 Impacto no solo de áreas reflorestadas	09
III. MATERIAL E MÉTODOS	11
III.1 Coleta de Material	11
III.2 Extração do DNA.....	13
III.3 Amplificação dos genes 16S rDNA.....	14
III.4 Purificação do produto do PCR	15
III.5 Clonagem do produto do PCR	16
III.6 Transformação de <i>E. coli</i>	16
III.7 Seleção e estoque de clones	17
III.8 Extração do DNA plasmidial.....	17
III.9 Quantificação do DNA plasmidial	18
III.10 PCR para seqüenciamento	19
III.11 Seqüenciamento dos produtos de PCR	19
III.12 Análise das seqüências.....	20
III.13 Preparação para análises filogenéticas.....	21
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
IV.1 Filo <i>Acidobacteria</i>	45
IV.2 Filo <i>Actinobacteria</i>	46
IV.3 Filo <i>Proteobacteria</i>	46
IV.4 Outros filios observados	48
IV.5 Comparações com outros trabalhos	49
IV.6 Índices de diversidade	52

V. CONCLUSÕES.....	53
VI. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	54
Apêndice.....	63

ABREVIATURAS

BOD – Demanda biológica de oxigênio (“Biologic Oxigen Demand”)
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP – Trifosfato de deoxirrinucleotídeo (“2'-deoxynucleotides 5'triphosphates")
EDTA – Ácido etileno de aminotetracético (“Ethylenediaminetetracetic acid”)
HCl – Ácido Clorídrico
IPTG – Isopropithiol - β -D- galactosídeo (“Isopropylthio- β -D-galactoside”)
KOAc - Acetato de Potássio
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
NaCl – Cloreto de Sódio
NaOH – Hidróxido de Sódio
RNase – Ribonuclease A
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (“Polimerase Chain Reaction”)
rDNA – Ácido desoxirribonucléico ribossomal
SAE – Solo sob arboreto com eucalipto
SFN – Solo sob floresta nativa
SDS – Duodecil sulfato de sódio (“Sodium duodecyl sulfate”)
Tris- Hidroximetil aminometano (“Hydroxymethyl aminomethane”)
X-GAL – 5'- bromo – 1 – cloro – 3 indolil -- β -D- galactopranosídeo (“5'-bromo- 1 – chloro- 3 –indolyl-- β -D-galactopyranoside”)

IDENTIFICAÇÃO DE COMUNIDADES BACTERIANAS DE SOLO POR SEQÜENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA

RESUMO - Métodos tradicionais de isolamento e cultivos limitam análises da diversidade microbiana no meio ambiente, pois acredita-se que aproximadamente 10% desses microrganismos possam ser cultivados. A ecologia microbiana molecular teve recentes progressos através da construção de bibliotecas metagenômicas, o que constitui uma poderosa abordagem para explorar a diversidade microbiana de solo fornecendo inclusive dados sobre os microrganismos não cultiváveis desse habitat. Este trabalho teve por objetivo comparar e estimar a diversidade de comunidades bacterianas, em solos de duas áreas, sendo solo de Floresta Nativa (SFN) e a outra sob arboreto com eucaliptos (SAE) de uma mesma região. Utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos, o gene 16S rRNA foi amplificado por PCR, os amplicons foram clonados em pGEM^R-T e os clones obtidos seqüenciados parcialmente. No solo SFN foram analisados 231 clones e no solo SRE 248 clones. As seqüências obtidas foram submetidas à análise de similaridade de nucleotídeos com o banco de dados GenBank. Os filos bacterianos que mais se destacaram nos dois tipos de solo foram *Acidobacteria* e *Proteobacteria*. No solo SFN destacaram-se também as bactérias pertencentes ao filo *Bacteroidetes* e no solo SAE observou-se alta freqüência das bactérias *Actinobacteria*. Análises filogenéticas revelaram diferenças em ambos os solos, verificando através de índice de diversidade bacteriana observou-se que o solo sob eucalipto apresentou maior diversidade quando comparado ao solo sob de Floresta Nativa.

Palavras chaves: diversidade microbiana, ecologia microbiana, metagenoma

IDENTIFICATION OF SOIL-BASED BACTERIAL COMMUNITIES BY SEQUENCING OF THE 16S rRNA GENE

ABSTRACT - Traditional methods of isolation and culture limits the analyses of the microbial diversity in the environment, it is believed - that approximately 10% of these microorganisms can be cultivated. The molecular microbial ecology had recent progress through the construction of metagenomics libraries, what constitutes a powerful approach to explore the microbial diversity of soil, also supplying information about the not-cultivating microorganisms of this habitat. This work had for objective the comparison and estimate of the diversity of bacterial communities, in the soil of two areas, which are: soil of Native Forest (SFN) and soil under eucalypts (SAE) of the same region. Using primers, the gene 16S rRNA was amplified by PCR, the amplicons had been cloned in pGEM^R-T and the obtained clones were sequenced partially. In soil SFN 231 clones were analyzed and in the soil SRE 248 clones. The sequences obtained had were submitted to the similarity analysis of nucleotides with the GenBank database. The bacterial filos that were more distinct in the two types of soil were *Acidobacteria* and *Proteobacteria*. In the soil SFN the bacteria pertaining to filo *Bacteroidetes* was also distinguished and in the soil SAE was observed high frequency of the *Actinobacteria* bacteria. Filogenetics analyses showed differences in both soils, and verifying through index of bacterial diversity was observed that the soil under eucalypts presented a greater diversity when compared with the soil under the Native Forest.

Keywords: microbial diversity, microbial ecology, Metagenomics

I. INTRODUÇÃO

Estudos sobre abordagens ecológicas e registros de diversidade bacteriana do meio ambiente são muito escassos. Atualmente, pouco se sabe sobre a função das bactérias nos ecossistemas, pois a maioria ainda não foi catalogada e não se encontrou uma metodologia adequada para o cultivo em laboratório. Buscando uma inovação nesta área, a ecologia molecular microbiana sofreu grandes avanços devido às técnicas do DNA recombinante, no final do século XX. Esta estratégia representa um caminho para estudar microrganismos não cultiváveis, auxiliando nos estudos da genômica funcional e possibilitando, futuramente, a obtenção da expressão de genes de microrganismos ainda desconhecidos. Esses estudos podem ainda resultar no conhecimento da expressão de metabólitos secundários, os quais podem resultar na obtenção de produtos de interesse econômico.

A técnica de clonagem molecular com a obtenção de bibliotecas metagenômicas, ou seja, bibliotecas de um conjunto de genomas encontrados na natureza, permitem realizar comparações entre comunidades bacterianas em duas ou mais áreas geográficas. Diferenças de diversidade de microrganismos podem ser avaliadas através de uma região conservada do genoma bacteriano denominada 16S rDNA (gene 16S rRNA), diminuindo as dificuldades das técnicas de cultivo e melhorando o entendimento sobre a diversidade dos microrganismos.

O gene 16S rRNA codifica para a subunidade ribossômica menor que é parte do sítio de ocorrência da síntese protéica e, portanto, está presente em todas as bactérias. Esse gene apresenta características conservativas ao longo da evolução e pode servir como indicador de como os microrganismos estão intimamente relacionados durante a evolução em milhões de anos.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo comparar e estimar a diversidade de comunidades bacterianas em solos de duas áreas distintas, ambas pertencentes ao Campus da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, F.C.A.V.-U.N.E.S.P.- Jaboticabal (S.P.), uma em solo sob floresta nativa e outra sob arboreto de eucalipto. A diversidade bacteriana foi avaliada através da extração direta de DNA do

solo, amplificação, clonagem e seqüenciamento do gene 16S rRNA e comparação das seqüências obtidas. Desta maneira, esse estudo se torna importante para ilustrar o impacto nas comunidades bacterianas, do solo em áreas reflorestadas por eucalipto.

II. REVISÃO DE LITERATURA

II.1 Os microrganismos nos ecossistemas

A biosfera é dominada por microrganismos (WHITMAN et al.,1998); não há áreas livres de microrganismos. Eles são encontrados no ar, nos solos virgens ou cultivados, limpos ou contaminados, nas camadas superficiais e subterrâneas e também em ambientes aquáticos, como água doce ou salgada (DROZDOWICZ, 1997; MARGULIS et al., 1998). Além do mais, contribuem significativamente para a biodiversidade na Terra (SEBAT et al., 2003). A ampla ocorrência de partículas virais infecciosas, mutações, plasmídios e outros elementos genéticos móveis e seus papéis nos processos de transdução, transformação e conjugação, permitem concluir que ecossistemas microbianos são comunidades geneticamente abertas (TERZAGHI e O'HARA, 1990) e com enorme potencial de aquisição de diversidade genética (WHITMAN et al., 1998).

Diversos fatores envolvem a formação do solo, como: tempo geológico, atividade biológica, topografia, clima, dentre outros; sendo estes fatores responsáveis pelas diferenças na atividade microbiológica. O solo não é considerado um ambiente isolado, pois existem ligações diretas dele com os microrganismos, água, ar, plantas e animais superiores (DROZDOWICZ, 1997). O solo constitui-se num dos principais reservatórios de carbono orgânico da Terra e um dos mais importantes habitats para os microrganismos, principalmente os procariotos. A abundância do carbono procariótico e de outros elementos sugere que cerca da metade do protoplasma vivo da Terra seja de origem microbiana (WHITMAN et al.,1998).

Para uma boa qualidade do solo é importante manter a diversidade de microrganismos, pois eles desempenham muitas funções importantes como remoção de toxinas, participação nos ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo, e outros (BORNEMAN et al., 1996). Além disso, vários estudos demonstram que o número de células e a biomassa de micróbios são dependentes das concentrações de partículas de silte e argila (SESSITSCH et al., 2001) e da vegetação existente (NÜSSLEIN e TIEDJE, 1999).

Desta maneira, muitos microhabitats existem no solo (ATLAS e BARTHA, 1998 c).

Existem muitas bactérias nativas que são descritas como participantes de alguns ecossistemas de solo, pois existem fatores abióticos como valores extremos de pH, temperatura e umidade que restringem o desenvolvimento dessas comunidades. Por outro lado, populações microbianas se tornam predominantes em diversos ambientes durante muitos anos, como em ambientes frios ou desertos que são usualmente quentes e áridos. Um bom exemplo é o gênero *Bacillus* que forma endosporos e sobrevivem por longos períodos de seca no solo é, normalmente, sem a necessidade de umidade do solo (ATLAS e BARTHA, 1998 c).

Geralmente, o solo favorece a proliferação de microrganismos e, dessa forma, o número de microrganismos no solo é, normalmente, mais abundante em relação ao ecossistema de água doce ou marinho, onde pode ser encontrado, uma taxa de 10^6 a 10^9 microrganismos por grama de solo. As concentrações de matéria orgânica no solo são relativamente altas se comparadas às de outros ecossistemas (ATLAS e BARTHA, 1998 a; DROZDOWICZ, 1997).

O domínio Bactéria compreende 23 filos (GARRITY et al., 2002). Os microrganismos pertencentes a este domínio ocorrem de maneira cosmopolita nos mais diversos habitats (CANHOS et al., 1997). Segundo estimativas realizadas por LEWINSOHN et al. (2002), existem de 300 a 450 espécies bacterianas descritas e conhecidas no Brasil. E para o ambiente mundial não alcança o número de 4200 espécies. E esta complexa diversidade bacteriana ainda tem que ser conhecida (MARGULIS et al., 1998). Existem diversos índices para calcular a população procariota, mas todos concordam em um aspecto: a diversidade dos microrganismos de solo é gigantesca (WARD, 2003).

Nem todas as bactérias encontradas no solo são como legítimas telúricas, ou seja, residentes legítimas do solo. Existem também aquelas classificadas ecologicamente, como residentes facultativas, pois são dependentes de substratos específicos presentes em determinados solos. Essas bactérias entram e proliferam-se no solo junto com excrementos, detritos vegetais e com cadáveres de animais. Bactérias, tanto telúricas como as outras, que têm seus nichos ecológicos em outros

ambientes que não o solo, são organismos microscópicos, unicelulares e procarióticos. Algumas vivem como células livres (DROZDOWICZ, 1997).

Uma alta proporção de bactérias Gram positivas são encontradas nos habitats dos solos quando comparados aos aquáticos, sendo que existem diferenças relativas nas proporções de gêneros bacterianos dentro de cada habitat (ATLAS e BARTHA, 1998 c). Por técnicas tradicionais, são encontradas no solo geralmente bactérias do gênero: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Artrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Caulobacter*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Xanthomonas* (ATLAS e BARTHA, 1998 c). Mas novos organismos podem ainda ser cultivados e caracterizados (SEBAT et al., 2003).

Particularmente o filo *Acidobacteria*, que representa a maioria e é extremamente comum no solo (KENT e TRIPLETT, 2002), possui apenas 03 espécies que foram descritas e cultivadas (GARRIT et al., 2002). Mesmo assim esse grupo contém poucas seqüências cadastradas no GenBank (HOLMES et al., 2000).

Outro grupo importante na microbiota do solo é o grupo dos Actinomycetos, composto de, aproximadamente, 10 a 33% das bactérias que existem no solo. São relativamente resistentes à dessecação em ambientes como desertos; crescem melhores em ambientes neutros ou alcalinos e são sensíveis em ácidos (ATLAS e BARTHA, 1998 c, HOLMES et al., 2000).

A maioria das bactérias do filo *Actinobacteria* tem como característica a produção de odor de mofo e degradação de substâncias muito complexas. Portanto, são importantes para o melhoramento do solo (CANHOS et al., 1997). Este grupo foi extensivamente estudado por HOLMES et al., (2000), que trabalharam com oligonucleotídeos específicos e notaram diferenças de comunidades em áreas distintas na Austrália. Além disso, segundo os autores este filo pode refletir uma especialização nos nichos observados em diferentes solos, especificamente o grupo das *Rubrobacteria*, que é uma classe pertencente a este filo que em áreas de deserto são extremamente abundantes e em solos de regiões chuvosas não foram detectados. Trabalhos relatam que o filo *Actinobacteria* geralmente é encontrado em pequenas comunidades em

relação a outros filos (LILES, 2001; KENT e TRIPLETT, 2002 e DUMBAR et al., 2002) e sua frequência em solos cultivados não é afetada (McCAIG, 1999 e PEREIRA, 2003).

O filo *Proteobacteria* apresenta grande diversidade de morfologia celular e fisiologia. As estratégias de obtenção de energia são várias, incluindo metabolismo quimiolitotróficos, quimiorganotróficos, fototrófico, além de outras vias metabólicas especializadas em microrganismos adaptados a nichos ecológicos diversos. Este filo apresenta coloração Gram negativa e subdivisões como: alfa, beta, gama, delta e epsilon (CANHOS et al., 1997).

O filo *Planctomycetes* é constituído por bactérias aeróbias encontradas principalmente em ambientes aquáticos. Este grupo tem como características: não apresentar peptidoglicano na parede celular e reprodução por brotamento (CANHOS et al., 1997).

II.2 Análises tradicionais e abordagens metagenômicas

Métodos tradicionais para o crescimento de microrganismos em condições laboratoriais ainda são ineficientes. Desta forma, muitos micróbios na natureza ainda não foram estudados (STALEY e KONOPLA, 1985; HUGENHOLTZ et al., 1998; DOJKA et al., 1998 RONDON et al., 2000). Estima-se que aproximadamente de 1 a 10 % dos microrganismos podem ser isolados por método cultura, em meio líquido ou sólido (BORNEMAN et al., 1996; KUSKE et al., 1997) e taxas relativamente baixas de novos microrganismos tem sido caracterizados e cultivados atualmente (SEBAT et al., 2003). Estudando-se apenas os microrganismos cultivados de um microhabitat podem-se perder conhecimentos sobre as interações biológicas essenciais nos relacionamentos ecológicos. Não é surpreendente que poucas observações importantes, relacionadas com ecologia microbiana, antecederam as técnicas moleculares, visto que, antes destas terem sido desenvolvidas, as informações a respeito das comunidades microbianas eram coletadas diretamente do ecossistema ou dos microrganismos isolados (ATLAS e BARTHA, 1998 b).

Deste modo, apenas o uso da taxonomia tradicional não supre as necessidades para o conhecimento de uma espécie bacteriana, tendo em vista a necessidade de situá-la, sobretudo, em seu contexto ecológico (CANHOS et al., 1997).

A partir da década de 80, um grande número de metodologias moleculares vem sendo desenvolvido para análise da diversidade microbiana dos solos (AMANN et al., 1995; ZHOU et al., 1996; BORNEMAN et al., 1997; CULLEN e HIRSCH, 1998; SANDAA et al., 1998;), tornando-se cada vez mais rotineiras (DROZDOWICZ, 1997).

Tais metodologias utilizam o DNA genômico total, extraído diretamente do meio ambiente e ampliações via PCR. Clonagem e seqüenciamento do gene do DNA/RNA ribossomal (rDNA/rRNA) tornam possível a identificação dos microrganismos ainda desconhecidos e não cultivados (BORNEMAN et al., 1996; CANHOS et al., 1997; DROZDOWICZ, 1997, VALADARES-INGLIS e MELO, 1998; DOJKA et al., 1996; MACRAE, 2000; KENT e TRIPLETT, 2002). Além disso, essas metodologias podem ser aplicadas para identificar genes a serem usados na biossíntese de produtos farmacêuticos e outros usos industriais e caracterizar genes de bactérias do meio ambiente, do solo e da água. (SEBAT et al., 2003). O estudo do DNA genômico obtido de um hábitat recebeu o nome de metagenoma (BORNEMAN et al., 1996; LUDWIG et al 1997; RONDON et al., 2000).

A utilização do gene 16S rRNA revolucionou o campo da ecologia microbiana e, com seu uso, é possível investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas de meio ambiente (LUDWIG, et al., 1997; KUSKE et al., 1997; HENTSCHEL, et al.,2002). Os estudos com o gene 16S rRNA foram iniciados por Carl Woese que argumentou que esta molécula era um excelente marcador molecular (ATLAS e BARTHA, 1998 b).

Os RNAs ribossomais estão entre as macromoléculas mais conservadas evolutivamente em todos os seres vivos. Seu papel funcional no sistema de processamento de informações deve ter sido bem estabelecido nos primeiros ancestrais comuns de Bactéria, Arquea e Eucaria. Os genes dos rRNA em todos os organismos contemporâneos partem de um ancestral comum e eles não parecem submeter-se à transferência lateral de gene entre espécies. Por causa das unidades funcionais,

grandes porções nos genes rRNA são bem conservadas e suas seqüências podem ser usadas para medir distâncias filogenéticas, mesmo entre os organismos mais distintamente relacionados. Variações nas seqüências dos nucleotídeos do gene de rRNA são indícios de mudanças evolucionárias. Resultados de filogenia baseados nas análises do gene 16S rRNA revelaram separação dos domínios Bactéria, Archaea e Eucaria. Estudos filogenéticos moleculares proporcionam uma idéia de evolução em grande escala; quando vista desta maneira mostram a importância dos microrganismos na história evolutiva da vida na Terra, que não pode ser ignorada (ATLAS e BARTHA, 1998 b.).

Com a evolução da aplicação das técnicas moleculares para o estudo da microbiota do solo, inúmeros métodos de extração de DNA foram aperfeiçoados. Tais métodos possuem procedimentos que envolvem a quebra ou digestão de paredes e membranas celulares para possibilitar a liberação do conteúdo genético da célula. Em geral, os métodos de extração de DNA do solo são demorados e requerem grande quantidade de amostras, reagentes e uso de compostos orgânicos. Em muitos casos a amplificação do material genético dos microrganismos do solo pode ser inibida por contaminantes como os compostos fenólicos ou ácidos húmicos, que são difíceis de serem removidos da extração, mesmo após vários passos de purificação. Além disso, as células microbianas podem ligar-se fortemente a colóides do solo, principalmente aqueles ricos em matéria orgânica e argilosa, dificultando a obtenção de DNA de alto peso moleculares (VALADARES-INGLIS e MELO, 1998). Para facilitar a extração do DNA dos microrganismos de solo, BORNEMAN (1996) utilizou o kit FastDNA® SPIN Kit for Soil, com o qual obteve uma maior eficiência na extração dos fragmentos de DNA de diversos organismos com tamanho entre 9 a 23 Kb, reduzindo o tempo de extração em 5 vezes em relação aos protocolos comumente praticados.

Oligonucleotídeos iniciadores como pA e pc5B foram utilizados por KUSKE et al. (1997), comparando populações microbianas de dois solos áridos do sudoeste dos Estados Unidos, com o objetivo de explorar sua diversidade. Esses autores construíram bibliotecas metagenômicas e seqüenciaram parcialmente o gene 16S rRNA e, através de agrupamentos filogenéticos, verificaram extensiva diversidade nas comunidades

bacterianas. Nesse trabalho foi observado, com relação à identificação dos microrganismos presentes no solo, que o seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA com aproximadamente 700 pb, apresenta resultados semelhantes aos encontrados no seqüenciamento total do gene. Observação similar foi apresentada por BORNEMAN (1996) em que se determina os principais grupos de microrganismos de solo, puderam ser utilizadas seqüências parciais do gene 16S rRNA. Além disso, essas seqüências parciais possuem algumas vantagens em relação às seqüências completas, como redução do tempo de análise, diminuição do custo do trabalho.

Atualmente a maneira adequada para identificar e classificar uma bactéria é recorrer ao “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” e “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (DROZDOWICZ, 1997; SAIT et al., 2002; HENTSCHEL et al., 2002).

II.3 Impacto no solo de áreas reflorestadas

A vegetação é um fator do meio ambiente que pode ser determinante na composição da comunidade microbiana do solo, pois fornece recursos preliminares para o crescimento heterotrófico. Além disso, as comunidades vegetais podem alterar fatores químicos e físicos do solo, favorecendo ou não o crescimento de diferentes espécies microbianas. Entretanto, existem poucos relatos sobre a influência dos vegetais na composição do solo e, conseqüentemente, nas comunidades microbianas do solo (NÜSSLEIN e TIEDJE, 1999). Um outro fator que pode interferir nas comunidades microbianas são os metabólitos microbiológicos, os quais podem agir de diversas maneiras, atuando como fatores probióticos ou antibióticos (DROZDOWICZ, 1997).

A matéria orgânica fornece condições para o desenvolvimento de microrganismos que direta ou indiretamente, contribuem para agregação e formação de estruturas estáveis. A transformação do material orgânico é determinada pela atividade dos microrganismos, variando de solo para solo ou até mesmo de espécie para espécie (FONSECA, 1984).

Com relação ao pH, LIMA (1996) comparou diversos trabalhos de outros

pesquisadores em áreas reflorestadas sob eucalipto e florestas naturais e verificou que nem sempre as áreas sob eucalipto apresentavam uma diminuição deste.

A utilização em larga escala de plantios puros de espécies do gênero *Eucalyptus*, nas áreas a serem reflorestadas, aumentou nas últimas décadas (FONSECA, 1984; HIGA et al., 1991). Isso ocorreu principalmente por causa da adequação da sensibilidade à seca das diferentes espécies (HIGA et al., 1991). Entretanto, tal procedimento tem sido bastante contestado, principalmente quanto à possibilidade de mudanças ecológicas no solo, diminuição da fertilidade e inibição da microbiota e da flora do local de plantio. No Brasil, poucos são os estudos a respeito das modificações que poderiam ser provocadas pelo reflorestamento com espécies de eucalipto (FONSECA, 1984). Para que haja uma escolha correta para o reflorestamento, os procedimentos mais indicados são: a pesquisa dos fatores biológicos que ocorrem no local e a origem das espécies que estão sendo cultivadas (HIGA e HIGA, 2000).

Por outro lado, o uso do reflorestamento com eucalipto é uma metodologia reconhecida como uma medida efetiva de longo prazo na recuperação de áreas degradadas. Trabalhos realizados no Brasil e em Portugal não verificaram alterações em parâmetros físicos e químicos do solo cultivado com eucalipto. Entretanto isso não pode ser confundido com o cultivo rotativo e curto dessa planta para fins industriais. Tal processo, pode causar déficit de nutrientes no solo (LIMA, 1996).

Um aspecto crítico na avaliação do impacto do eucalipto sobre as propriedades do solo está relacionado com a microbiologia do solo. É comum encontrar na literatura referências e sugestões de que o eucalipto exerceria um poder antibiótico sobre os microrganismos do solo, o que em si, merece uma avaliação mais profunda. Outros aspectos devem ser observados como relação íntima dessa microbiologia e mineralização do nitrogênio, ciclagem de nutrientes e, conseqüentemente, manutenção da produtividade do sítio (LIMA, 1996). Contagens microbiológicas revelaram que o eucalipto não interfere na população microbiana do solo, sendo que em longo prazo o efeito sobre o arboreto pode ser benéfico. Existem relatos comprovando que há maiores quantidades de microrganismos no solo sob o eucalipto comparativamente à floresta natural. Não foi evidenciado nenhum efeito adverso dessa planta no solo, sendo que o

desequilíbrio na microbiologia do solo está associado a outros fatores, como o fogo, que prejudica os primeiros 15 cm da camada superficial, perturbações do solo e alterações no microclima de cada unidade (LIMA, 1996). Em contrapartida, um dos experimentos realizados por PINTO e NAHAS (2002), utilizando o meio de Bunt e Rovira (1955) mostra uma maior quantidade de bactérias sob a floresta isolada e integrada com $5,6 \times 10^8$, $28,7 \times 10^8$ respectivamente, em relação à área sob eucalipto com $19,2 \times 10^8$ bactérias no Campus de Jaboticabal – UNESP.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1 Coleta de Material

As amostras de solo com características de Latossolo Vermelho foram coletadas em Maio de 2002 (0-20 cm) em duas áreas, ambas localizadas nas dependências da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – (FCAV- UNESP- S.P.- Brasil), cujas coordenadas geográficas são: latitude $21^{\circ}17'05''$ S e longitude $48^{\circ}17'09''$ L e altitude em torno de 590 m. A primeira coleta de solo foi realizada em uma área experimental do próprio Campus com floresta nativa (SFN), não manipulada pelo homem e caracterizada como sub-bosque rico em arbustos. O outro solo foi coletado em uma área de arboreto de eucalipto (SAE), plantado em Fevereiro de 1969, que não sofreu nenhum trato cultural desde então. De cada solo foram coletadas doze amostras simples ao acaso, em ziguezague e com profundidade de 0-20 cm, abrangendo toda a área. As amostras foram reunidas e homogeneizadas, resultando em uma amostra composta. Posteriormente, foram conduzidas ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), no Departamento de Tecnologia, no mesmo Campus e imediatamente estocadas a -20°C , para realização da extração do DNA metagenômico dos solos. Os parâmetros de propriedades químicas e granulométricas destas áreas são apresentados na tabela 1.

O valor médio anual de precipitação pluviométrica da localidade foi de 1408,7 mm nos últimos trinta anos e a temperatura média anual é de 22°C , sendo o valor mínimo

12°C e o valor máximo 32°C (Fonte: Estação Agroclimatológica – UNESP – Campus Jaboticabal).

Tabela 1. Parâmetros químicos e granulométricos dos Latossolos Vermelhos de floresta nativa (SFN) e arboreto com eucalipto. (SAE).

Parâmetros	SFN	SAE
pH (CaCl ₂)	6,2	5,5
Matéria orgânica (g/dm ³)	75	61
P (mg/dm ³)	63	17
K (mmol _c / dm ³)	2,9	4,8
Ca (mmol _c / dm ³)	410	49
Mg (mmol _c / dm ³)	80	40
H + Al (mmol _c / dm ³)	15	28
Argila (g/Kg)	430	440
Limo(g/Kg)	256	120
Areia Fina (g/Kg)	130	180
Areia Grossa (g/Kg)	184	260
Classe textural	Argilosa	Argilosa

III.2 Extração do DNA

A extração de DNA total das comunidades bacterianas existentes no solo foi realizada segundo BORNEMAN et al. (1996) com FastDNA® SPIN Kit for Soil – (BIO 101 - Catálogo nº #6560-200) de acordo com a instrução do fabricante. O procedimento consistiu em lisar os microrganismos presentes nas amostras, colocando-se 500 mg de solo em tubos com sílica e adicionando-se 978 µL de tampão de fosfato de sódio (pH 8.0) e 122 mL de tampão MT(BIO 101 – Catálogo nº 6511-202). A suspensão com o solo foi agitada vigorosamente pelo FastPrep^R FP120 (Bio 101 – Savant), por 30 segundos, a velocidade de 5.5 m/s e, posteriormente, o tubo foi centrifugado a 14.000 x g, por 1 minuto, a temperatura ambiente.

O sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo estéril e a ele foram adicionados 250 µL de uma solução de precipitação de proteínas, misturando-se cuidadosamente a amostra por inversão por 10 vezes. Em seguida, a solução foi centrifugada a 14.000 x g, por 5 minutos, a 25°C para precipitação do sedimento formado. O sobrenadante foi coletado, transferido para um tubo estéril e a ele adicionado 1 mL do “Binding Matrix Superior”. A amostra foi misturada por inversão durante 2 minutos e, posteriormente, o tubo foi deixado em repouso por 3 minutos, à temperatura ambiente. Deste tubo foram removidos 500 µL do sobrenadante e o restante foi misturado em um agitador de tubo. Todo o volume desta solução foi transferido para um tubo com filtro e este foi centrifugado a 14.000 x g, por 1 minuto, à temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e, novamente, repetiu-se a centrifugação por 1 minuto. Adicionaram-se 500 µL de solução de lavagem de sais e etanol nomeada de SEWS-M ao filtro e este foi centrifugado a 14.000 x g, por 3 minutos, à temperatura ambiente, para precipitação dos fragmentos de DNA. O tubo com o filtro foi seco por centrifugação em um aparelho liofilizador por 10 minutos (Hetovac), para melhor evaporação do etanol no precipitado. O DNA foi eluído adicionando-se no filtro 50 µL da solução DES contendo água estéril ausente de DNase, e centrifugado a 14.000 x g, por 2 minutos, à temperatura ambiente. No final, as amostras foram mantidas a -20°C.

A quantificação do DNA foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). A eletroforese foi realizada em uma cuba modelo Horizon 11-14 com uma alíquota de 3 µL de DNA adicionada de 3 µL de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol) e conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), a 100 V. Foi aplicado no gel um plasmídeo pGEM de concentração conhecida (50 ng/µL) em diferentes volumes para comparar a intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídio. A visualização do DNA foi realizada sob luz UV e a imagem foi documentada em um aparelho fotodocumentador (Bio Rad – Gel doc 1000), através do software Quantity One^R (Bio RadTM, Hercules, CA, USA).

Foi preparada, após a quantificação do DNA, uma solução de trabalho, na qual o DNA foi diluído em água ultrapura estéril para se obter uma concentração adequada de 10 ng/µL para realização da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

III.3 Amplificação dos genes 16S rRNA

Os DNAs extraídos e quantificados dos microrganismos dos solos foram amplificados pela reação de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene 16S rRNA bacteriana contendo:

- tampão PCR 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl],
- 200 µM de cada desoxiribonucleotídeo,
- 1,5 mM de MgCl₂, 50 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador,
- 2,5 U de Taq DNA polimerase (InvitrogenTM, São Paulo, Brasil).
- 50 ng de DNA molde, em um volume final de 50 µL.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram os mesmos utilizados por KUSKE et al., (1997), o pA "forward" (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3', localização em *Escherichia coli*: bases 8 a 27) e o pc5B "reverse" (5'-TAC CTT GTT

ACG ACT T-3', localização em *E. coli*: bases 1507 a 1492). As amostras foram amplificadas em um termociclador de acordo com o programa utilizado por: 94°C, por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final por 5 minutos, a 72°C. Ao final do programa as amostras permaneceram no aparelho a 4°C até serem retiradas.

III.4 Purificação do produto da PCR

Após a obtenção dos produtos da PCR, estes foram reunidos e aplicados em um gel preparativo de agarose "low melting" 1% (Gibco -catálogo 15517-014). A corrida eletroforética foi conduzida em tampão TBE 1 X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), a 35V por 16 horas para melhor visualização do fragmento amplificado. A região do gel contendo os fragmentos amplificados foram separadas e colocadas em diversos tubos estéreis e para cada 10 mg de gel adicionou-se 30 µL de solução de NaCl 1 M e, em seguida, foram incubadas por 10 minutos a 65°C. Após este período, adicionou-se 1 volume de fenol equilibrado (Ultrachem, Tris-HCl pH 7,8), agitando-se vigorosamente por 2 minutos, seguindo-se de uma centrifugação a 14.000 x g, por 10 minutos, a temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram coletados e a estes adicionado 1 volume de fenol equilibrado; agitando-se por 2 minutos e em seguida centrifugado a 14.000 x g, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram coletados e adicionado 1 volume de clorofórmio, agitando-se os tubos vigorosamente por 2 minutos os quais foram centrifugados a 14.000 x g, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Coletaram-se os sobrenadantes e, em seguida, adicionou-se a estes 1/10 do volume de Acetato de Sódio 3 M, pH 6,8 e 2 volumes de etanol absoluto gelado. As soluções foram incubadas a -70°C, por 1 hora. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g, por 30 minutos, a 4°C e, em seguida removeu-se os sobrenadantes. Ao precipitado adicionou-se 1 mL de etanol 70% gelado e nova centrifugação foi realizada a 14.000 x g, por 5 minutos, a 4°C. Posteriormente, descartaram-se os sobrenadantes deixando-se os resíduos secarem por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram ressuspensas em 5 µL com TE 10:1 (Tris 10

mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Também foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de 260 nm para proteínas. A relação 260/280 nm foi estimada para verificar a pureza do DNA.

III.5 Clonagem do produto da PCR

Os produtos da PCR do gene 16S rRNA dos solos de SFN e SAE foram clonados em vetor pGEM-T(Promega -catálogo nº catálogo # A3600), conforme as instruções do fabricante. A reação de ligação do produto de PCR 16S rDNA ao vetor, consistiu-se de:

- 1 µL de T4 DNA ligase (3 U/µL),
- 5 µL de tampão de T4 ligase 1X,
- 54 ng de pGEM-T;
- aproximadamente 225 ng do produto amplificado, para uma reação com volume final de 10 µL. A reação permaneceu a 4°C por 16 horas.

III.6 Transformação em *E. coli*

O plasmídio recombinante foi inserido em células competentes de *E. coli*, linhagem DH5α [gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB), do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV - UNESP/Jaboticabal]. Para cada biblioteca, realizou-se o processo de transformação da seguinte forma: 5 µL do material ligado foram adicionados 50 µL de células competentes em tubo de 15 mL estéril. Incubaram-se as células por 30 minutos no gelo, em seguida estas foram incubadas em banho-maria a 42°C, por 90 segundos e, posteriormente, deixadas no gelo, por mais 2 minutos. Foram adicionado às células 950 µL de meio SOC (2 g de bacto-triptona, 500 mg de extrato de levedura, 1 mL de NaCl 1 M, 250 µL de KCl, 1 mL de MgCl 2 M, 1 mL de glicose 2 M, completando-se com 100 mL

de água filtrada qsp) incubando em seguida por 2 horas a 37°C com agitação de 160 rpm.

Após este período, 120 µL das células foram semeadas em placas de Petri de 14 cm de diâmetro, contendo meio de cultura 2 TY (16 g/L de triptona, 10 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de NaCl e Agar 5g/L), suplementado com ampicina (50 µg/mL). Sobre o meio de cultura espalhou-se, previamente, 80 µL de IPTG (100 mM) e 60 µL de X-gal (50 mg/mL). As placas contendo bactérias transformadas foram incubadas em BOD a 37° C, por 16 horas.

III.7 Seleção e estoque de clones

As colônias contendo os plasmídeos com os insertos foram identificadas através da coloração branca nas placas com meio 2 TY/X-gal/IPTG. Essas colônias foram coletadas com palitos estéreis e depositadas em microplacas com 96 poços, contendo 100 µL de meio CG “CircleGrow” (Bio 101 – catálogo nº 3000-142), adicionadas de ampicilina (50 µg/mL). As placas foram seladas e mantidas em BOD a 37°C por 22 horas. Posteriormente, aos clones foram adicionados 100 µL de glicerol 40% para estocagem dos mesmos clones em freezer – 85° C.

III.8 Extração do DNA plasmidial

O DNA plasmidial dos clones selecionado foi isolado por procedimento de “mini prep” (SAMBROOK, et al., 1989) com a introdução do uso do filtro (PVDF – 0.2 µm – Millipore) para purificação do material.

Os clones foram cultivados em 1 mL de meio CG acrescido com ampicilina (50 µg/mL) . Posteriormente, os clones foram mantidos a 37°C, a 10 x g, por 22 horas em placas Megatiter. Após o cultivo, as placas contendo os clones foram centrifugadas por 6 minutos, 20°C, a 3.220 x g e os sobrenadantes foram descartados e as placas invertidas por 5 minutos em papel absorvente para total eliminação do meio de cultivo. Adicionou-

se aos clones 240 μL de GTE [Glicose 50 mM; Tris-HCl 25 mM (pH 8,0); EDTA 10 mM] por poço. Agitou-se vigorosamente até que todas as células ficassem ressuspendidas. O material foi centrifugado por 6 minutos, a 20°C e 3220 x g; os sobrenadantes foram novamente descartados e as células foram ressuspendidas em uma solução de GTE/RNase (80 μL de solução de GTE acrescida de 5 μg de Ribonuclase A). Foram transferidos 60 μL de cada suspensão celular para microplaca de 250 μL e às amostras foram adicionados 60 μL da solução de lise (NaOH 0,2 N; SDS 1%). As placas foram seladas, invertidas por 10 vezes, incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 20°C, por 30 segundos, a 50 x g. Às amostras adicionaram-se 60 μL de solução de acetato de potássio 3 M e novamente foi realizada mistura por inversão. As placas foram centrifugadas a 20°C, por 30 segundos; foram deixadas à temperatura ambiente por 10 minutos e a 90°C por 30 minutos. Após esse período as amostras foram colocadas em gelo por 10 minutos e centrifugadas a 20°C e 3.220 x g durante 6 minutos.

Todo o volume das microplacas foi filtrado em (filtro PVDF – 0.2 μm – Millipore), através de centrifugação por 6 minutos, a 20°C e 3220 x g. Adicionou-se ao filtrado 110 μL de isopropanol absoluto e a solução foi então misturada por inversão (20 vezes); o material foi centrifugado por 45 minutos, a 20°C e 3.220 x g, e o sobrenadante de cada amostra foi descartado, deixando as placas invertidas em papel absorvente, por 5 minutos. Adicionou-se às amostras 200 μL de etanol 70% gelado e, posteriormente, foi centrifugada por 5 minutos, a 20°C, a 3.220 x g. Os sobrenadantes foram descartados e as placas invertidas em papel absorvente por 5 minutos.

As amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 1 hora, para secagem do precipitado e foram ressuspendidas com 50 μL de água mili-Q (Millipore) autoclavada e incubadas por 16 horas, a 10° C para solubilização do material.

III.9 Quantificação do DNA plasmidial

Uma alíquota de 3 μL de DNA adicionada de 3 μL de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol), foi aplicada no gel de agarose 1%.

Um DNA plasmidial pGEM (Applied Biosystems) de concentração conhecida (50 ng/ μ L), foi aplicado em diferentes volumes para comparar a intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídeo e cálculo de concentração do material.

A eletroforese foi realizada em uma cuba modelo Horizon 58 (Gibco – Horizontal Gel Electrophoresis) e conduzida em tampão TBE 1 X (Tris 89 mM; Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), acrescido de brometo de etídeo (0,5 μ g/ mL) durante 1 hora, a 100V constante. O DNA plasmidial foi visualizado sob luz UV e documentado em fotodocumentador modelo Gel DOC 1000 (Bio – Rad, Hercules, CA, USA), pelo software “Quantity One^R”.

III.10 PCR para seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas em microplacas utilizando o kit “DNA Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism” . Versão 3. As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando-se:

- 0,4 μ L dos terminadores Big Dye;
- 3,2 pmoles dos iniciadores “forward”;
- 100 ng de DNA plasmidial;
- 4,6 μ L de tampão 2,5 X (400 mM Tris-HCl, pH 9; 10 mM $MgCl_2$); e completando-se a reação com H_2O mili-Q estéril para 10 μ L.

O oligonucleotídeo iniciador utilizado foi M13/pUC 1211 (“forward” 5’ – GTAAAACGACGGCCAGT – 3’). A reação foi submetida a um termociclador seguindo o programa: 1 ciclo a 96°C por 2 minutos, 40 ciclos de 96°C por 10 segundos, 52°C por 20 segundos e 60°C. Ao final do programa as amostras no aparelho permaneceram a 10°C até serem retiradas.

III.11 Seqüenciamento dos produtos da PCR

Após a reação, as amostras foram preparadas para o seqüenciamento. Foram adicionados 80 µL de isopropanol 75%, sendo as mesmas agitadas levemente. Posteriormente, as amostras permaneceram por 15 minutos em temperatura ambiente e foram centrifugadas a 3.220 x g, por 45 minutos, a 20°C. Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante e as placas foram deixadas por 5 minutos, invertidas em papel absorvente. Às placas foram adicionados 150 µL de etanol 70%, centrifugadas a 3.220 x g por 5 minutos, a 20°C. Esta última operação foi repetida por mais duas vezes e as amostras foram secas em fluxo laminar por 1 hora.

Em seguida, as amostras foram ressuspendidas com 9 µL Hi-Di Formamide – Catálogo – P/N 4311320 (ABI Prism) e desnaturadas a 95°C por 5 minutos. O seqüenciamento dos clones foi realizado no seqüenciador capilar modelo ABI 3700 – Perkin Elmer.

III.12 Análise das seqüências

Para se verificar a qualidade das seqüências geradas utilizou-se o programa “Sequencing Analysis 3.4”, que gerou os eletroferogramas que foram submetidos à análise pelo programa “Phred/Phrap/Consed” (GORDON et al., 1998). A seleção das seqüências adequadas foi realizada pelo programa Phred, o qual analisa a qualidade das seqüências, visualizando graficamente pelo Consed e gerando arquivos no formato “fasta”, na qual o nível de exigência mínima foram de 250 bases com qualidade Phred acima de 20, auxiliado pelo programa “Contgen.pl”

Preliminarmente, as seqüências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com seqüências depositadas no banco de dados GenBank acessado através do “site” do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). A ferramenta utilizada para esta consulta foi o BLAST local - “Basic Local Alignment Search Tools” (ALTSCHUL et al., 1997), realizada em 06/06/2003, em uma “workstation” SUNBLADE 1000 (SUN Microsystems), pelo “site” do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (<http://lbmp.fcav.unesp.br/blast>).

Foi desenvolvido e utilizado um banco de dados metagenômico interno, através de um programa MySQL (Sistema de Gerenciamento de Banco de Dados Relacional) para facilitar as comparações entre as comunidades microbianas dos solos, (<http://lbmp.fcav.unesp.br/metagenoma>).

As seqüências foram preparadas para o alinhamento pelo programa “BioEdit v5.0.9” (HALL, 1999) e subsequencialmente alinhados pelo programa “CLUSTALX v.1.81” (THOMPSON et al., 1997).

III.13 Preparação para análises filogenéticas

Os fragmentos das seqüências dos produtos de PCR do gene 16S rRNA, foram clonados de maneira não direcional, portanto terminais 3' e 5' foram seqüenciados parcialmente em ambas bibliotecas, utilizando-se apenas um oligonucleotídeo iniciador. Desta maneira, as seqüências foram separadas em quatro filogramas, dois para cada solo e, posteriormente, foram subdividas para melhor interpretação dos dados e melhor visualização do “bootstrap”. A enumeração dos clones realizou-se de acordo com os resultados obtidos pelo “Blast” e em ordem de número de acesso do Genbank (“geneid” ou código de acesso ao GenBank). Os clones que possuíam freqüência maior do que um foram selecionados através de análises de eletroferogramas do programa “DNA Sequencing Analysis 3.4” e também pelo resultado de pontuação do “Blast”, para que na árvore filogenética contenha apenas um representante da seqüência do gene 16S rRNA relatado pelo NCBI.

Para matriz de distância das árvores filogenéticas utilizou-se o método de construção da árvore “neighbor-joining” (SAITOU e NEI, 1987) com 400 bases e com algoritmo “Jukes-Cantor” (JUKES et al., 1969), respectivamente, processado pelo programa de Análise Genética de Evolução Molecular MEGA versão 2.1.(KUMAR et al., 2001).

No filograma foram utilizados somente os clones que possuíam um índice de similaridade maior do que 85% pela classificação taxonômica do gene 16S rRNA, e os clones com classificação taxômica em filo, foram acompanhados pelos seus respectivos

representantes do NCBI. Todos os clones de cada solo pesquisado foram acompanhados pela sua percentagem de homologia com relação às seqüências do NCBI. Os dados de “bootstrap” representaram repetições de 1000 vezes.

Para análises estatísticas foi utilizado o índice de diversidade ACE, utilizando o programa “EstimateS versão 6.0b1” [R.K. Colwell, Dept^o de Ecologia e Biologia Evolucionária, Universidade Connecticut (<http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>) (HILL, 2003).

Para a nomenclatura dos agrupamentos dos filos neste trabalho foi utilizado “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology “ (GARRITY et al., 2.002).

IV. Resultados e Discussão

O método de extração do DNA do solo das duas áreas foi considerado adequado e gerou DNA com alta qualidade e rendimento suficiente para obtenção das bibliotecas metagenômicas. O material obtido apresentou fragmentos com alto tamanho molecular acima de 10 Kb (Figura 1) com relação 260/280 nm de 1,9 e concentrações médias de 400 ng/mL para SAE e 300 ng/mL para SFN. Os DNAs obtidos foram utilizados para a reação da PCR com oligonucleotídeos específicos para região 16S rDNA e resultaram na amplificação de um fragmento em 1500 pb e rendimento adequado para a construção das bibliotecas metagenômicas (Figura 2). Foram seqüenciados de cada biblioteca parcialmente 288 clones correspondentes ao solo da Floresta (SFN) e à área de solo com eucalipto (SAE). Após os processos de análises da qualidade das seqüências obteve-se em 231 e 248 clones respectivamente, para o estudo do SFN e SAE. Todas as seqüências observadas foram de origem bacteriana demonstrando dessa forma a eficiência do oligonucleotídeos iniciadores. Não foram observadas seqüências ainda não cadastradas no “GenBank” e a taxa de similaridade das seqüências dos clones de SFN e SAE variou entre 85 a 100 % em relação às do banco de dados do NCBI.

As seqüências bacterianas encontradas neste trabalho já foram descritas em diversas regiões geográficas do mundo como: amostras de solos da região Amazônica (BORNEMAN et al., 1997); amostras de solos de diferentes regiões dos E.U.A. (BORNEMAN et al., 1996; KUSKE et al., 1997; DOJKA et al., 1998; NÜSSLEIN e TIEJE, 1999; RODON et al., 2000; FURLONG et al., 2002; VALINSKY et al., 2.002; DUNBAR et al., 2.002), da Austrália (HOLMES et al., 2000), da Escócia (McCAIG et al., 1999) e Alemanha (NOGALES et al., 2001), fontes termais da Islândia (MARTEINSSON et al., 2001), sedimentos e águas pluviais da China (CHO e KIM, 2000; HIRASHI et al., 1995) e águas do Mar Mediterrâneo (HENTSCHEL, 2002), demonstrando a característica cosmopolita desses microrganismos (AMAN et al., 1995).

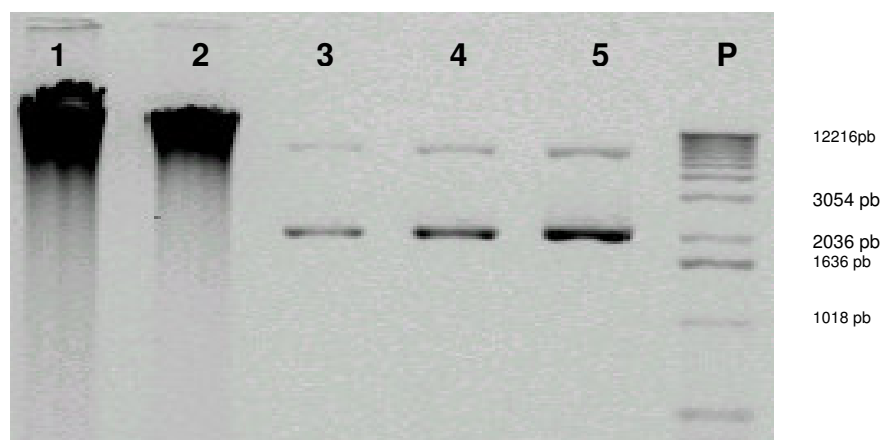


FIGURA 1- Perfil eletroforético de DNA metagenômico em Gel de Agarose (1% P:V), contendo Brometo de etídeo (0,5mg/μl). Canaletas: (1) DNA metagenômico SFN, (2) DNA metagenômico SAE, (3), (4) e (5) padrão de concentração pGEM (Applied Biosystems) 50 ng, 100 ng e 150 ng, (P) padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder -Gibco Molecular- Nº catálogo- 15615-016)

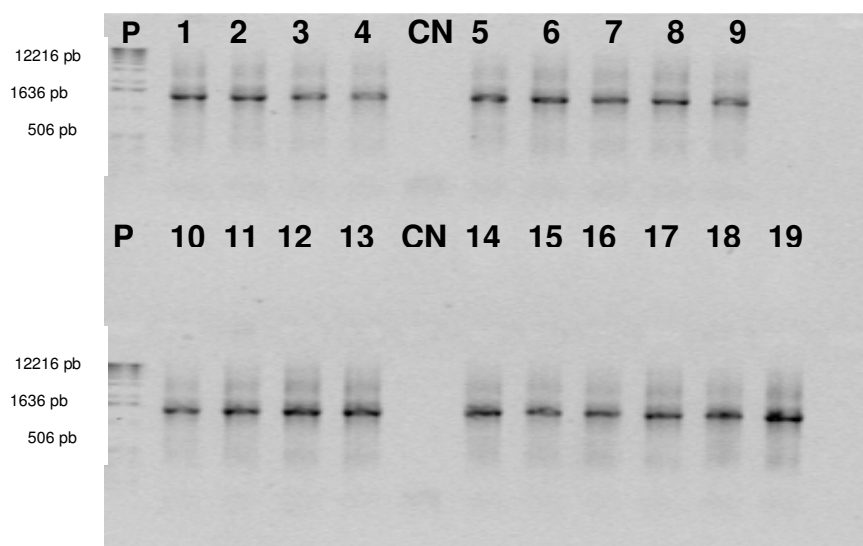


Figura 2. Perfil eletroforético em gel de Agarose 1% contendo Brometo de etídeo (0,5 mg/μl) gerados de fragmentos de DNA pela amplificação do DNA metagenômico com o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores pA/ pc5B . Canaletas: CN – Controle Negativo; P – Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder -Gibco Molecular - Nº catálogo- 15615-016); PCR com SAE: 1 a 9; PCR com SFN : 10 a 19.

Primeiramente, pela análise do “Blast”, detectou-se um alto índice de bactérias não classificadas taxonomicamente, 75% e 70% de frequência para as bibliotecas SFN e SAE respectivamente (Tabela 2), que, segundo BORNEMAN, et al (1996) isto pode significar uma composição heterogênea do solo.

Devido aos altos índices de seqüências bacterianas não classificadas nos solos estudados foi realizada, neste trabalho, comparação de seqüências parciais dos genes 16S e os agrupamentos genéticos moleculares para classificação das bactérias (Figuras 4 a 17) através de agrupamento filogenético (filogramas). Tais filogramas não tinham como objetivo realizar classificação filogenética e evolutiva dos microrganismos, mas apenas auxiliar o agrupamento das seqüências não classificadas em relação aos filos a que pertencem. Este tipo de informação de seqüenciamento da subunidade 16S rRNA não é suficiente para caracterizar as comunidades bacterianas desconhecidas em nível de gênero ou espécie, precisa-se de mais informações sobre análises fisiológicas e morfológicas através de cultivo em meio de cultura (GARRITY et al., 2002). Entretanto, esta classificação possibilitou observar diferenças entre as comunidades bacterianas de SFN e SAE, ou seja, a área sob arboreto apresentou diferenças na sua comunidade bacteriana, detectando representantes distintos em relação a SFN.

Nas figuras de 4 a 17 podem ser observados os agrupamentos filogenéticos obtidos, descritas na figura 18.

Tabela 2 - Distribuição dos clones do gene 16S rRNA nas bibliotecas SFN e SAE pela análise das seqüências utilizando-se o programa BLAST – Local (ALTSCHUL et al., 1997) em 06/06/2003.

Dominio : Bacteria	SFN Nº de clones observados	Frequência %	SAE Nº de clones observados	Frequência %
FILOS				
<i>Acidobacteria</i>	10	4,30	10	4,32
<i>Actinobacteria</i>	07	3,00	21	8,46
<i>Bacteroidetes</i>	01	0,40	02	0,80
<i>Firmicutes</i>	04	1,70	08	3,22
<i>Nitrospirae</i>	01	0,40	-----	-----
<i>Planctomycetes</i>	02	0,80	02	0,80
<i>Proteobacteria</i>	31	13,60	23	9,27
<i>Verrucomicrobia</i>	02	0,80	09	3,62
Não Classificados	173	75	173	70
TOTAIS	231	100	248	100

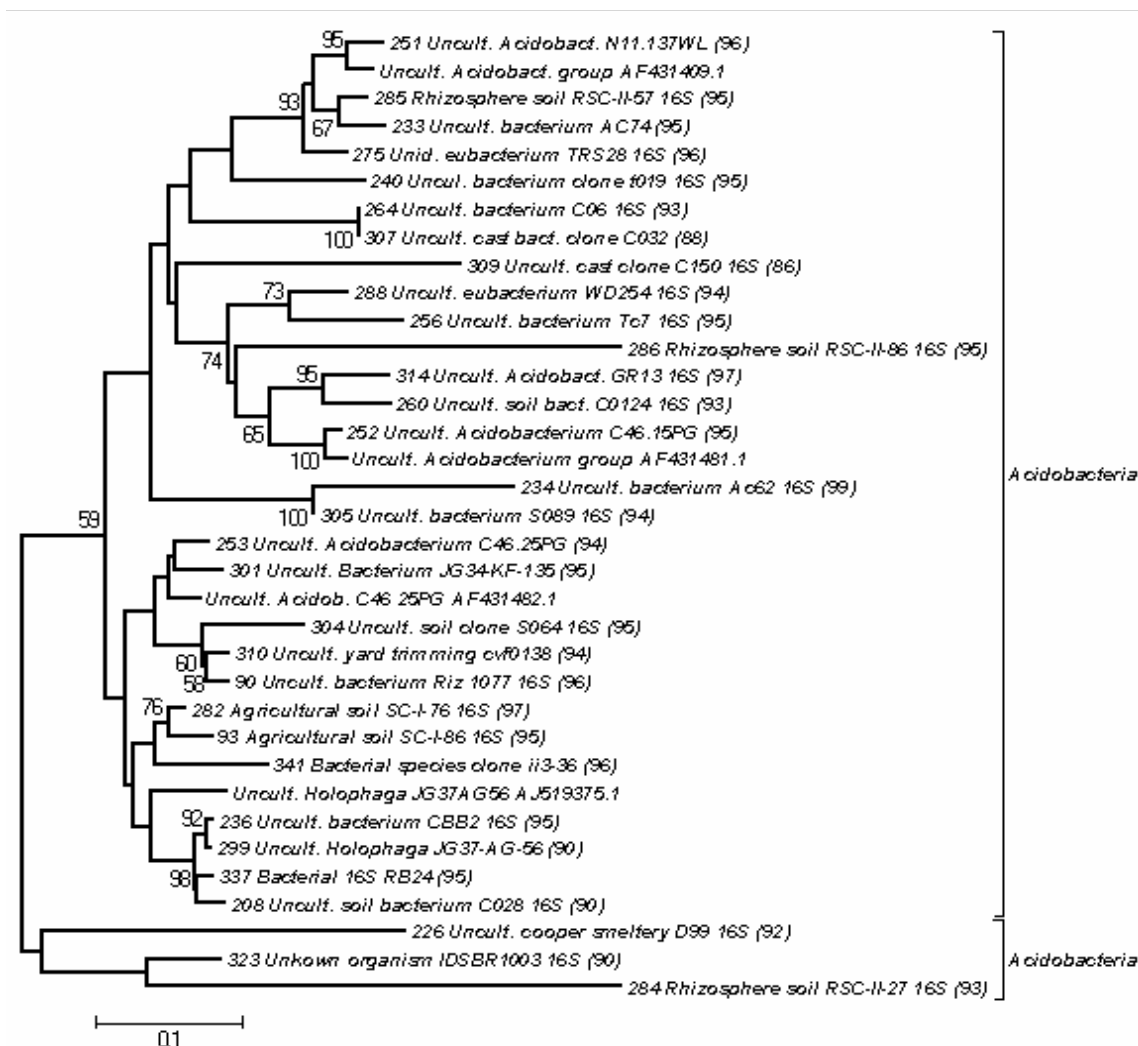


Figura 4 – Dendrograma filogenético exibindo os clones pertencentes ao filo *Acidobacteria* obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo sob floresta nativa (SFN). A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelos algoritmos “Jukes Cantor” e “Neighbor-Joining” com “bootstrap” de 1000 repetições. Todos os clones seqüenciados foram enumerados anteriormente e as seqüências do banco foram indicadas pelo nº de acesso GenBank. O valor entre parênteses é a similaridade, em porcentagem, com as seqüências do banco de dados. As abreviaturas foram designadas como Uncult., Uncultured; Unid., Unidentified; *Acidobact.*, *Acidobacteria*; bact., bactéria.

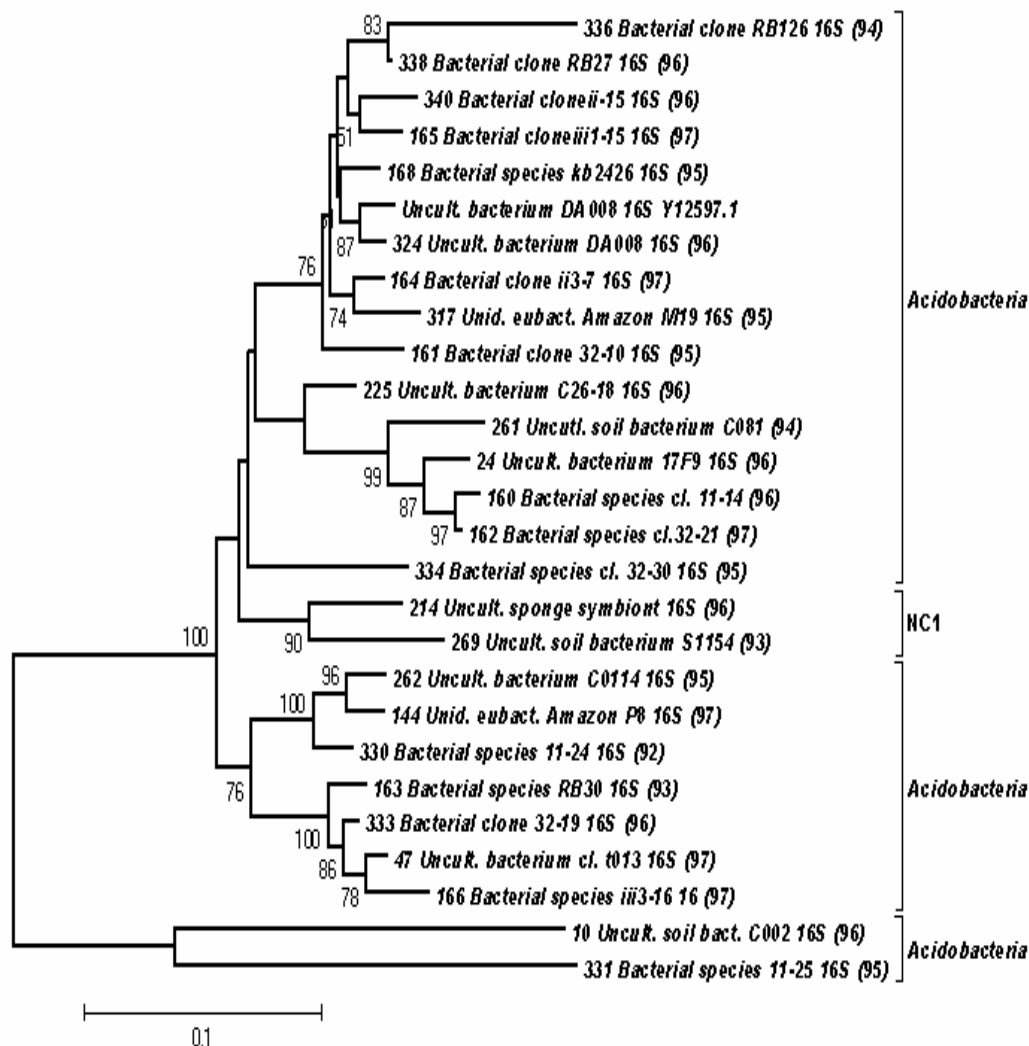


Figura 5 – Dendrograma filogenético exibindo os clones pertencentes ao filo *Acidobacteria* obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (3'-5') do solo sob floresta nativa (SFN). A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelos algoritmos "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 repetições. Todos os clones seqüenciados foram enumerados anteriormente e as seqüências do banco foram indicadas pelo nº de acesso GenBank. O valor entre parênteses é a similaridade, em porcentagem, com as seqüências do banco de dados. NC representam os clones não classificados. As abreviaturas foram designadas como Uncult., Uncultured; Unid., bact., bactéria.; eubact., eubacterium; cl., clone.

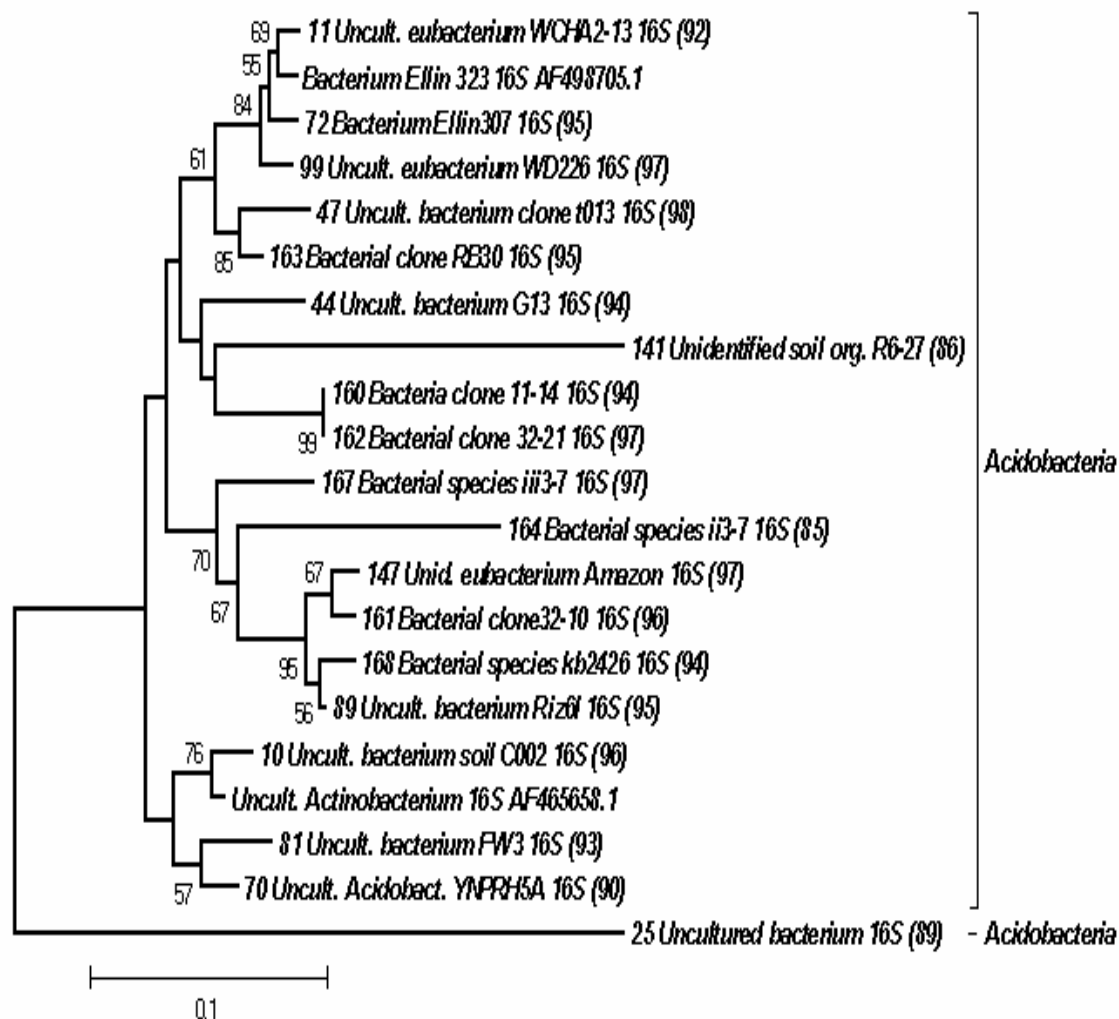


Figura 6 – Dendrograma filogenético dos clones pertencentes ao filo *Acidobacteria* obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'- 3') do solo sob arboreto de eucalipto (SAE). A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelos algoritmos “Jukes Cantor” e “Neighbor-Joining” com “bootstrap” de 1000 repetições. Todos os clones seqüenciados foram enumerados anteriormente e as seqüências do banco foram indicadas pelo nº de acesso GenBank. O valor entre parênteses é a similaridade, em porcentagem, com as seqüências do banco de dados. As abreviaturas foram designadas como *Uncult.*, *Uncultured*; *Unid.*, *Unidentified*; *Acidobact.*, *Acidobacteria*.; *bact.*, *bactéria*.

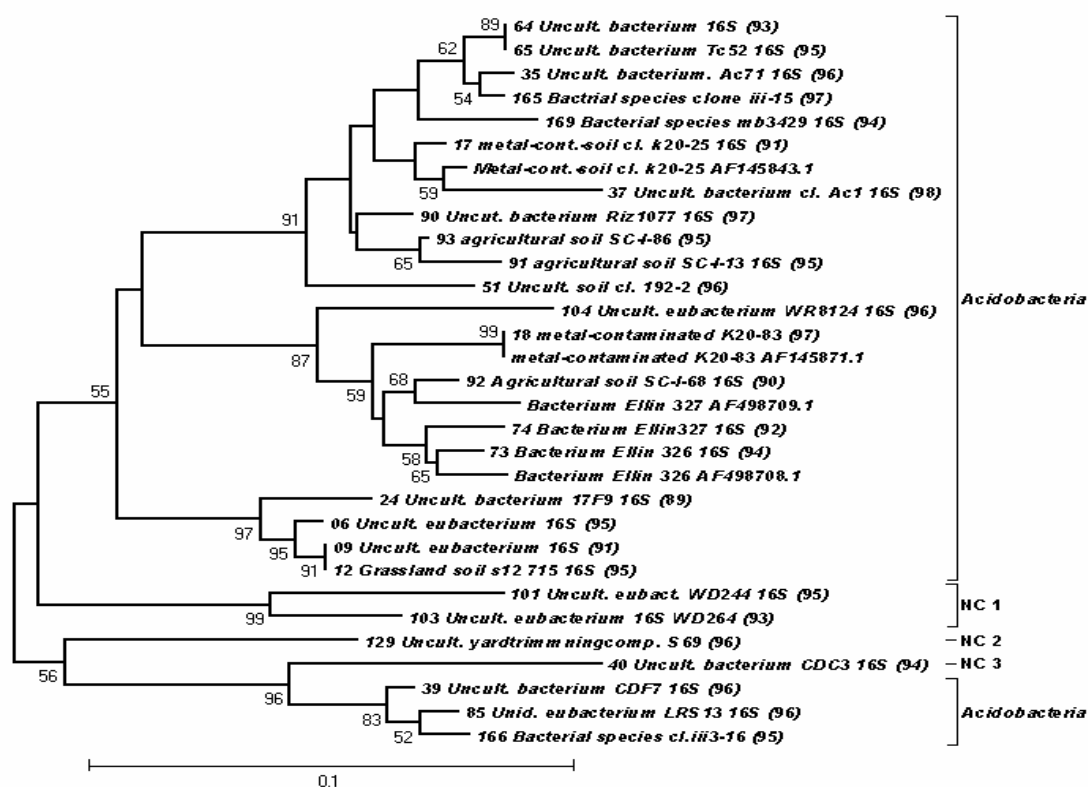


Figura 7 – Dendrograma filogenético dos clones pertencentes ao filo *Acidobacteria* obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (3'- 5') do solo sob arboreto de eucalipto (SAE). A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelos algoritmos "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 repetições. Todos os clones seqüenciados foram enumerados anteriormente e as seqüências do banco foram indicadas pelo nº de acesso GenBank. O valor entre parênteses é a similaridade, em porcentagem, com as seqüências do banco de dados. NC representam os clones não classificados. As abreviaturas foram designadas como Uncult., Uncultured; Unid., Unidentified; eubact., eubacterium; cl., clone.

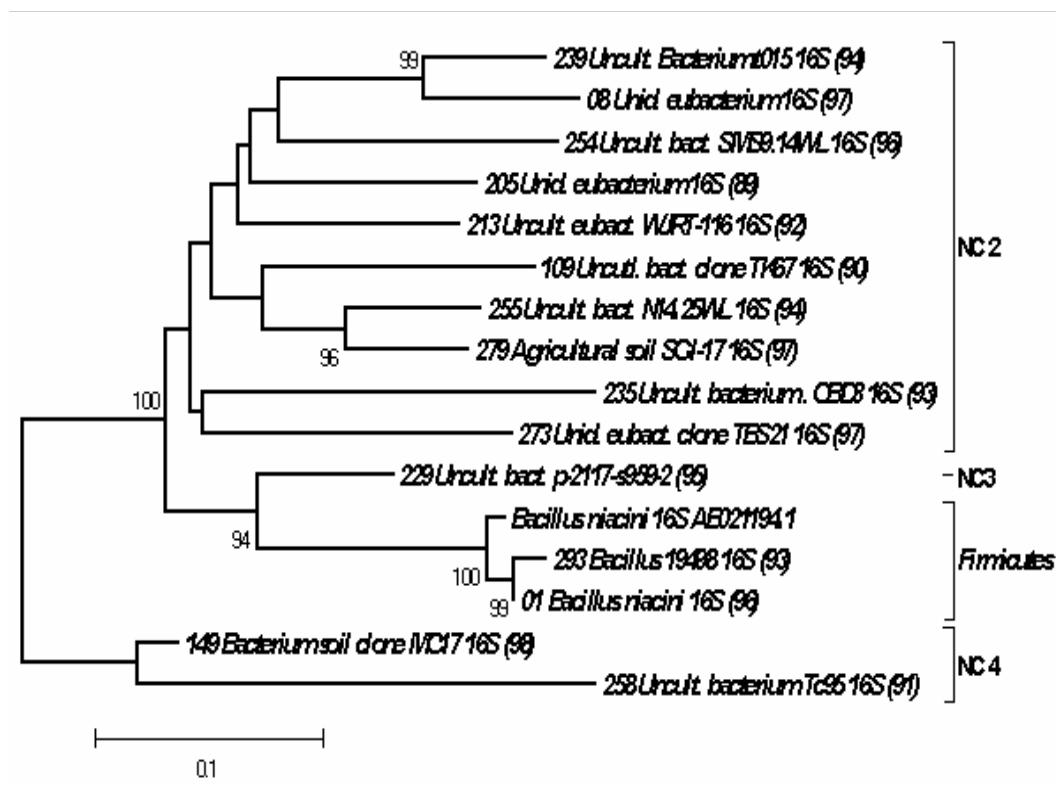


Figura 8 – Dendrograma filogenético exibindo os clones pertencentes ao filo *Firmicutes*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo sob floresta nativa (SFN). A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelos algoritmos "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 repetições. Todos os clones seqüenciados foram enumerados anteriormente e as seqüências do banco foram indicadas pelo nº de acesso GenBank. O valor entre parênteses é a similaridade, em porcentagem, com as seqüências do banco de dados. NC representam os clones não classificados. As abreviações foram designadas como Uncult., Uncultured; Unid., Unidentified; eubact., eubacterium.

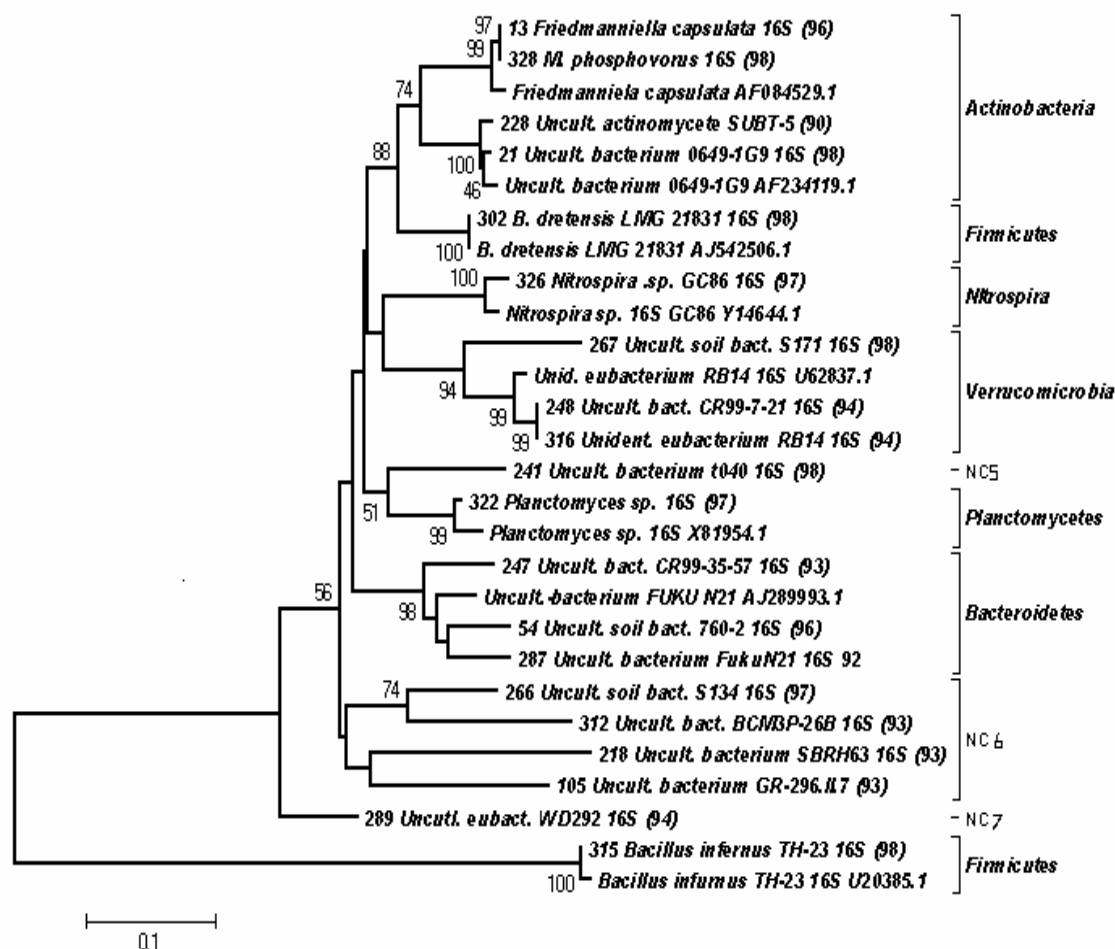


Figura 9 – Dendrograma filogenético exibindo os clones pertencentes ao filo *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Bacteroidetes* obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (3'- 5') do solo sob floresta nativa (SFN). A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelos algoritmos "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 repetições. Todos os clones seqüenciados foram enumerados anteriormente e as seqüências do banco foram indicadas pelo nº de acesso GenBank. O valor entre parênteses é a similaridade, em porcentagem, com as seqüências do banco de dados. NC representam os clones não classificados. As abreviaturas foram designadas como Uncult., Uncultured; Unid., Unidentified; eubact., eubacterium; *B.*, *Bacillus*; *M.* *Microlunaltus*.

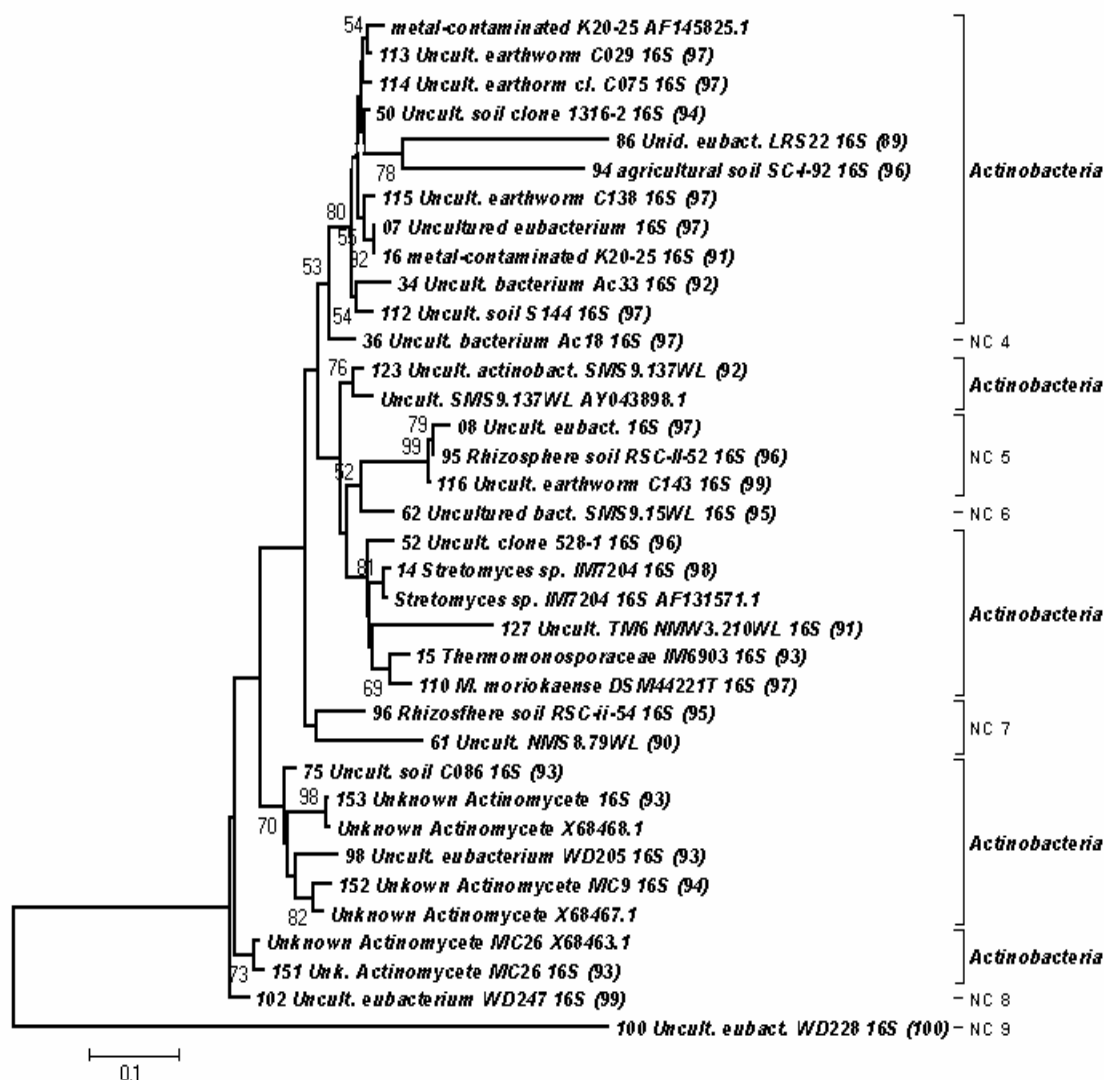


Figura 10 – Dendrograma filogenético exibindo os clones pertencentes ao filo *Actinobacteria* obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'- 3') do solo sob arboreto de eucalipto (SAE). A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelos algoritmos “Jukes Cantor” e “Neighbor-Joining” com “bootstrap” de 1000 repetições. Todos os clones seqüenciados foram enumerados anteriormente e as seqüências do banco foram indicadas pelo nº de acesso GenBank. O valor entre parênteses é a similaridade, em porcentagem, com as seqüências do banco de dados. NC representam os clones não classificados. As abreviaturas foram designadas como Uncult., Uncultured; Unid., Unidentified; Eubact., Eubacterium; cl., clone.

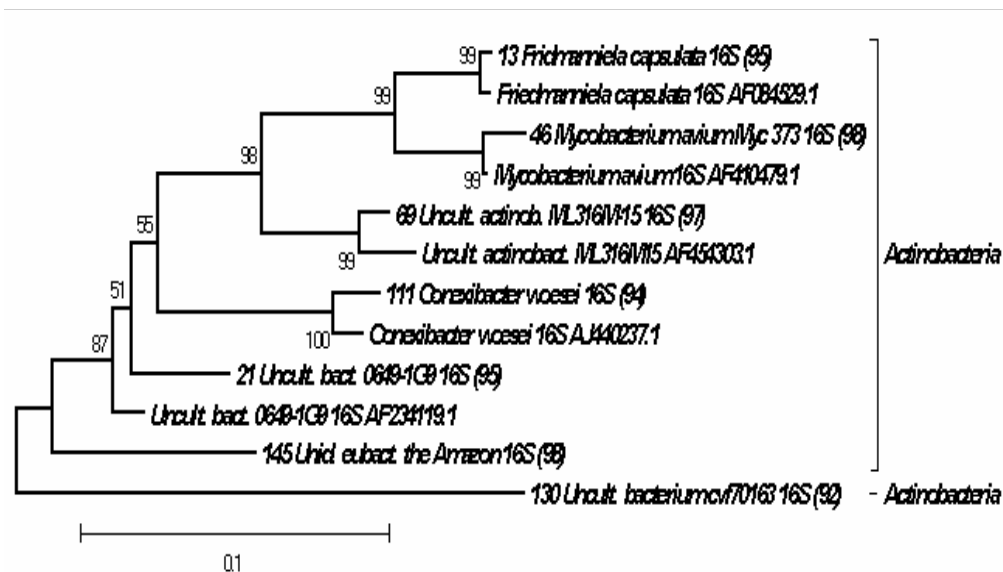


Figura 11 – Dendrograma filogenético exibindo os clones pertencentes ao filo *Actinobacteria* obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (3'-5') do solo sob arvoreto de eucalipto (SAE). A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelos algoritmos "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 repetições. Todos os clones seqüenciados foram enumerados anteriormente e as seqüências do banco foram indicadas pelo nº de acesso GenBank. O valor entre parênteses é a similaridade, em porcentagem, com as seqüências do banco de dados. NC representam os clones não classificados. As abreviaturas foram designadas como Uncult., Uncultured; bact., bacterium; Actinobact., *Actinobacteria*; org., organisms.

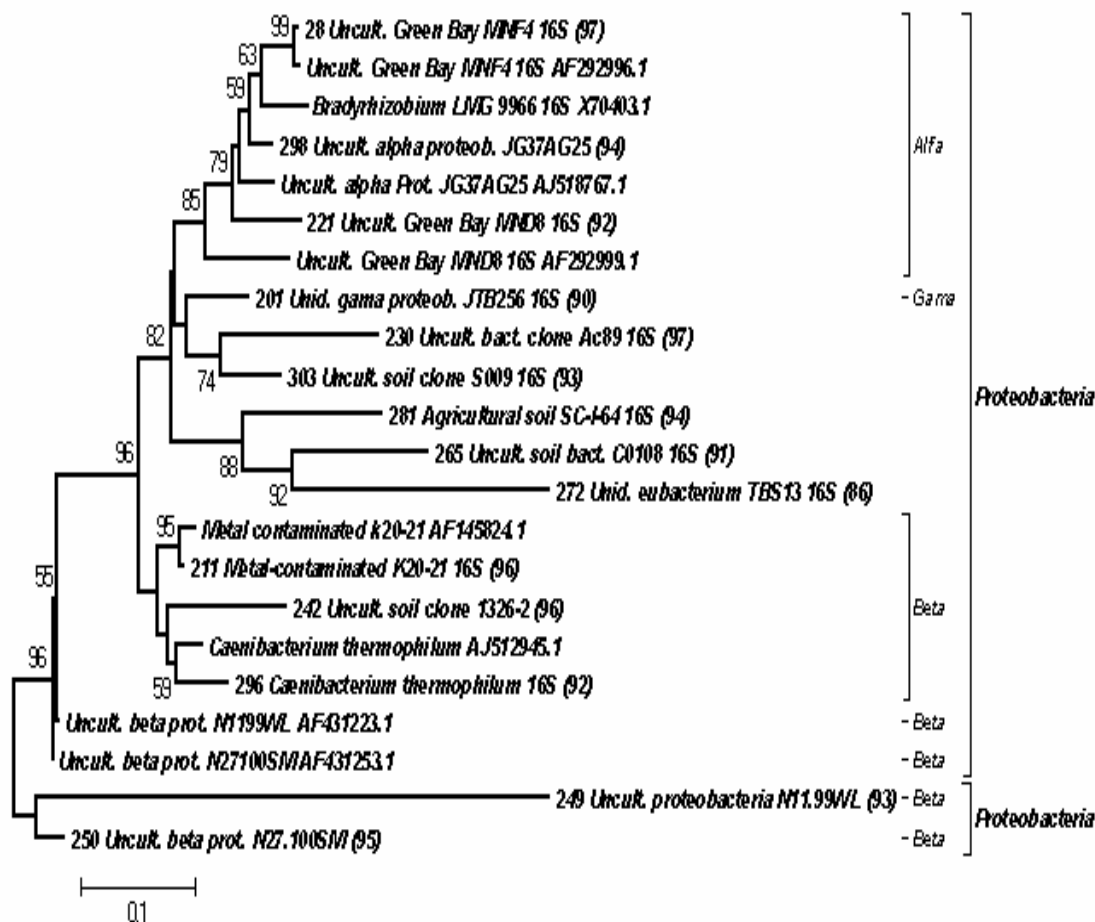


Figura 12 – Dendrograma filogenético exibindo os clones pertencentes ao filo *Proteobacteria* obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo sob floresta nativa (SFN). A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelos algoritmos "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 repetições. Todos os clones seqüenciados foram enumerados anteriormente e as seqüências do banco foram indicadas pelo nº de acesso GenBank. O valor entre parênteses é a similaridade, em porcentagem, com as seqüências do banco de dados. As abreviaturas foram designadas como Uncult., Uncultured; bact., bactéria; cl., clone; Unid., Unidentified; Proteob., *Proteobacteria*; betaprot., *Beta-Proteobacteria*.

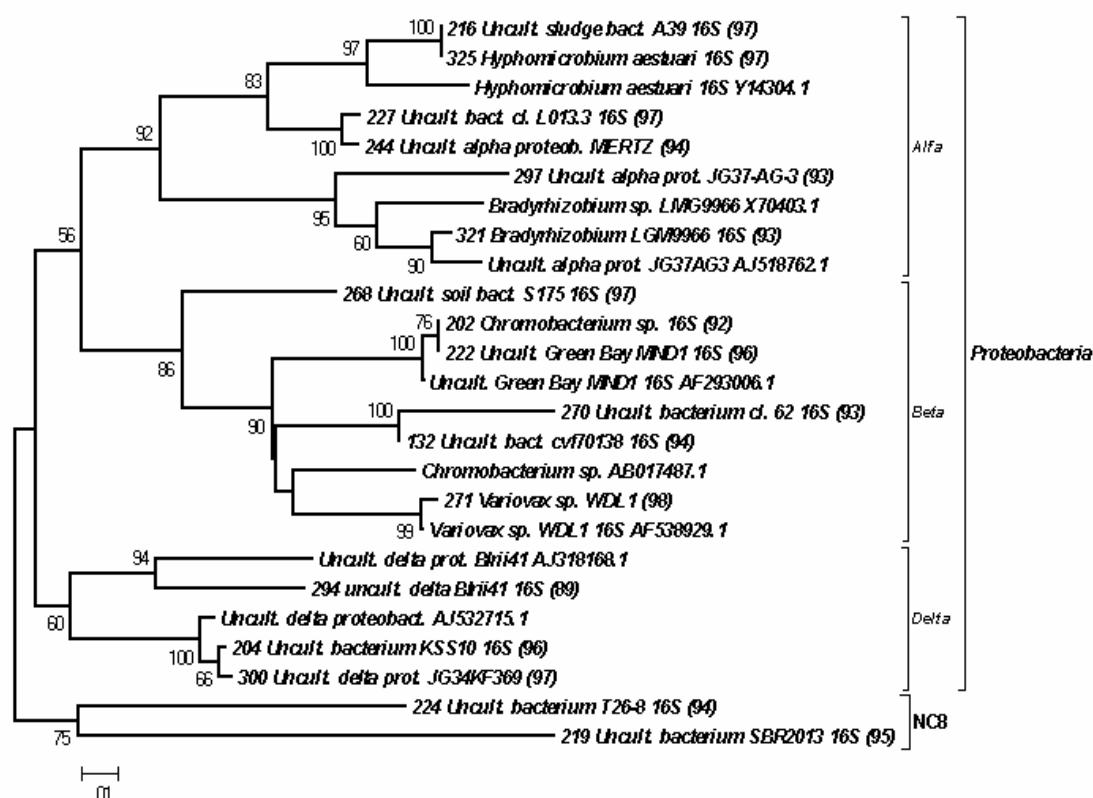


Figura 13 – Dendrograma filogenético exibindo os clones pertencentes ao filo *Proteobacteria* obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (3'-5') do solo sob floresta nativa (SFN). A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelos algoritmos "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 repetições. Todos os clones seqüenciados foram enumerados anteriormente e as seqüências do banco foram indicadas pelo nº de acesso GenBank. O valor entre parênteses é a similaridade, em porcentagem, com as seqüências do banco de dados. NC representam os clones não classificados. As abreviaturas foram designadas como Uncult., Uncultured; bact., bactéria; cl., clone; Unid., Unidentified; Proteob., *Proteobacteria*; betaprot., *Beta-Proteobacteria*.

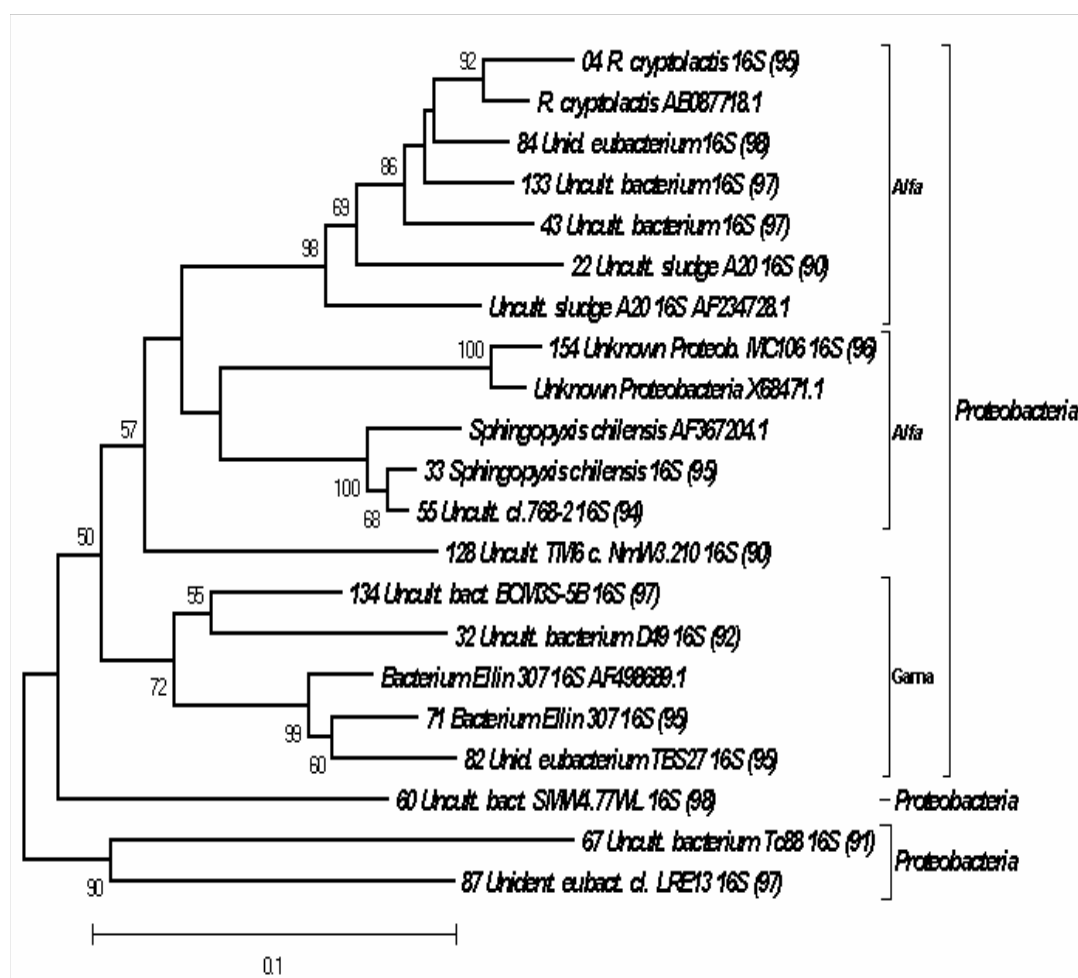


Figura 14 – Dendrograma filogenético exibindo os clones pertencentes ao filo *Proteobacteria* obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'- 3') do solo sob arboreto de eucalipto (SAE). A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelos algoritmos "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 repetições. Todos os clones seqüenciados foram enumerados anteriormente e as seqüências do banco foram indicadas pelo nº de acesso GenBank. O valor entre parênteses é a similaridade, em porcentagem, com as seqüências do banco de dados. As abreviaturas foram designadas como Uncult., Uncultured; Unid., Unidentified; eubact., eubacterium; cl., clone.

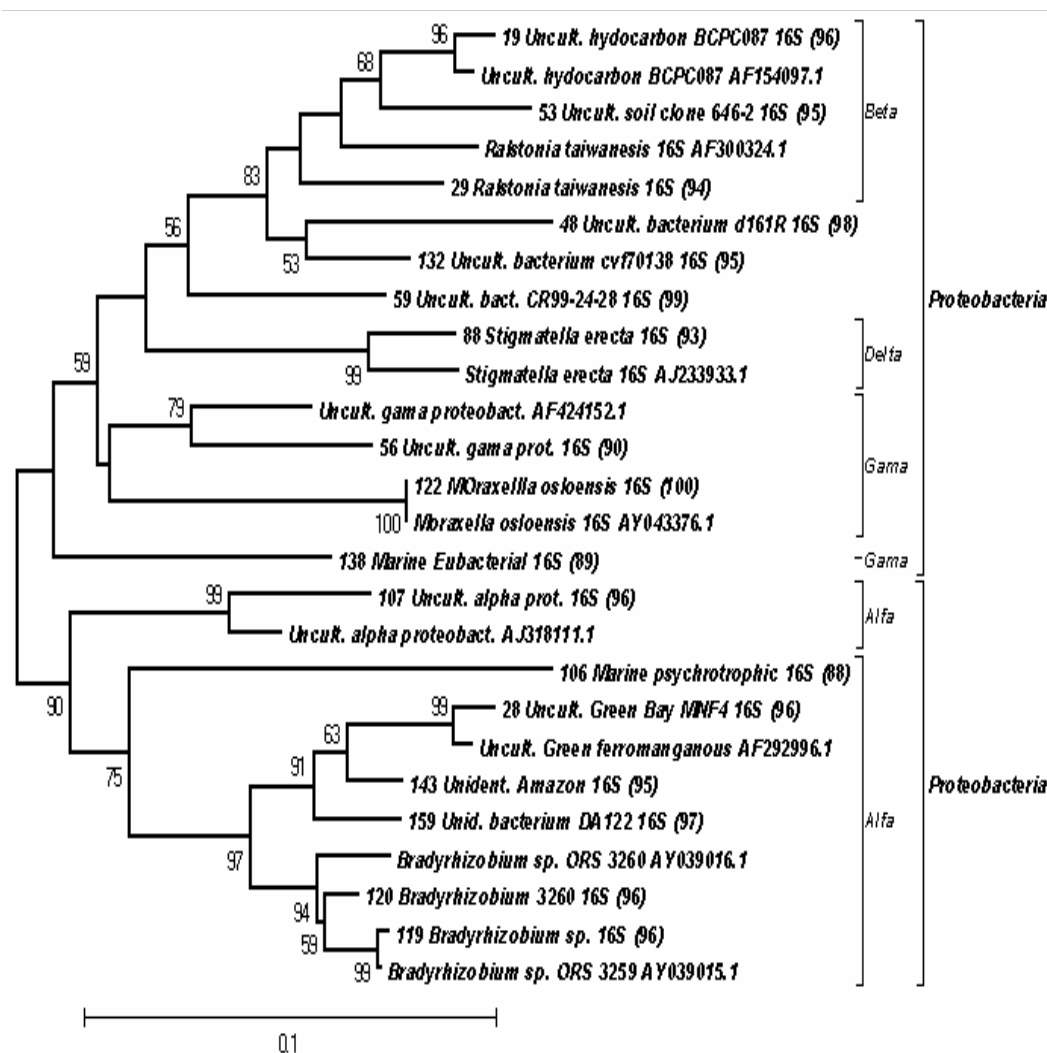


Figura 15 – Dendrograma filogenético exibindo os clones pertencentes ao filo *Proteobacteria* obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (3'- 5') do solo sob arboreto de eucalipto (SAE). A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelos algoritmos "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 repetições. Todos os clones seqüenciados foram enumerados anteriormente e as seqüências do banco foram indicadas pelo nº de acesso GenBank. O valor entre parênteses é a similaridade, em porcentagem, com as seqüências do banco de dados. As abreviaturas foram designadas como Uncult., Uncultured; Unid., Unidentified; eubact., eubacterium; cl., clone; org., organisms.

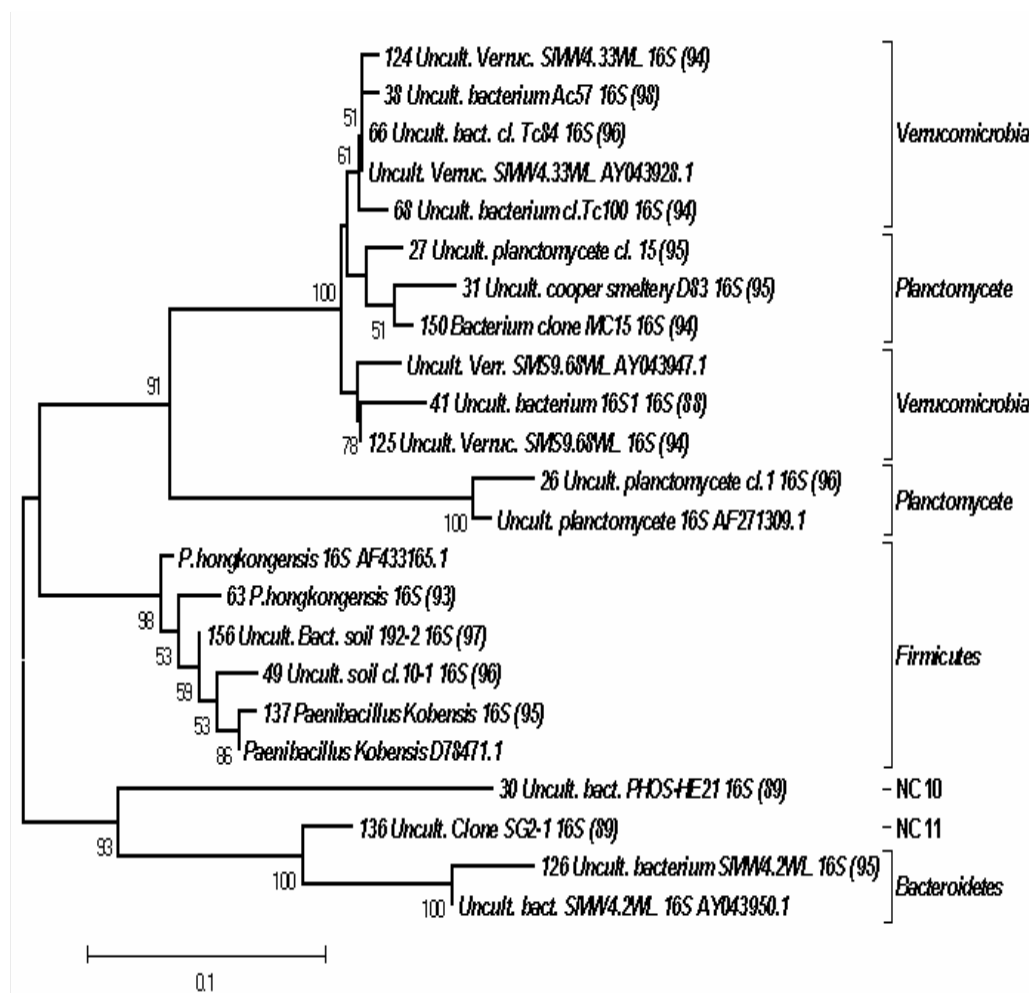


Figura 16 – Dendrograma filogenético exibindo os clones pertencentes ao filo *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo sob arboreto de eucalipto (SAE). A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelos algoritmos "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 repetições. Todos os clones seqüenciados foram enumerados anteriormente e as seqüências do banco foram indicadas pelo nº de acesso GenBank. O valor entre parênteses é a similaridade, em porcentagem, com as seqüências do banco de dados. NC representam os clones não classificados. As abreviaturas foram designadas como Uncult., Uncultured; P. *Paenobacillus*.

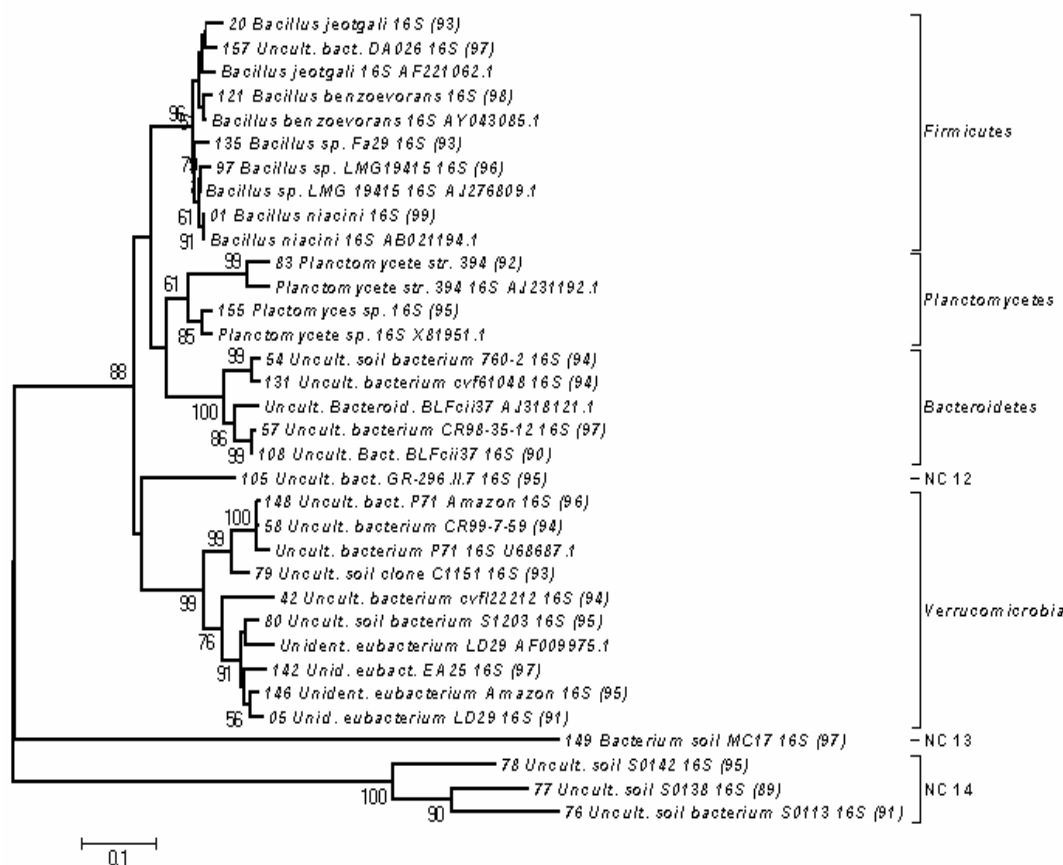


Figura 17 – Dendrograma filogenético exibindo os clones pertencentes ao filo *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (3'-5') do solo sob arboreto de eucalipto (SAE). A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelos algoritmos "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 repetições. Todos os clones seqüenciados foram enumerados anteriormente e as seqüências do banco foram indicadas pelo nº de acesso GenBank. O valor entre parênteses é a similaridade, em porcentagem, com as seqüências do banco de dados. NC representam os clones não classificados. As abreviaturas foram designadas como Uncult., Uncultured; Unid., Unidentified; eubact., eubacterium;

Após as análises dos filogramas houve uma reorganização nos números de representantes bacterianos dos clones não classificados, sendo esse número reduzido para 20,34% em SFN e 11,68% em SAE (Figura 18).

Dos clones que se apresentavam como não classificados pela análise do Blast ,a grande maioria se agrupou dentro do filo *Acidobacteria* (Tabela 3). Na biblioteca SFN, o filo *Acidobacteria* reuniu o maior número de seqüências de clones considerados não classificados pelo relatório do BLAST, nele se agrupou 24 representantes com freqüência de 42,40% enquanto que na biblioteca SAE 34 representantes distintos e freqüência de 22% foram observados. A maioria dos clones catalogados foi encontrada em diversos solos, inclusive aqueles cultivados com plantas transformadas geneticamente, floresta tropical e solo árido (Tabela 3). Estes clones anteriormente desconhecidos foram catalogados como microrganismos não cultiváveis pertencentes a solos de florestas tropicais, florestas norte americanas, áridos, reservas de experimentos agrônômicos, campos cultivados com diversos tratamentos, solos de pastagens, amostras de rizosferas de solo com plantas geneticamente modificadas.

O segundo maior agrupamento observado foi o do filo *Proteobacteria* na biblioteca SFN com 11 representantes distintos (5,19% freqüência) e 18 representantes (15% freqüência) na biblioteca SAE. Da mesma maneira esses microrganismos foram encontrados em estudos de solos de florestas tropicais, campos cultiváveis, áridos, reserva de experimentação agrônômica. Todas essas seqüências foram depositadas no “GenBank”, mas não submetidas à publicação.

Na biblioteca SFN os demais filos em destaque foram *Verrucomicrobia* com 01 representante (0,43% de freqüência) e *Bacteroidetes* com 02 representantes com 6,06% de freqüência. Por outro lado, na biblioteca SAE pode ser observado seqüências como *Actinobacteria* (14 representantes e 11% de freqüência), *Verrucomicrobia* (10 representantes e 8,5% de freqüência), *Firmicutes* e *Bacteroidetes* ambos com 03 representantes e 1,20% de freqüência e por último o filo *Planctomycetes* 01 representante e 0,4% de freqüência (Tabela 3).

Apesar de a grande maioria das seqüências bacterianas terem sido agrupadas pela construção de filograma foi observado representantes que não puderam ser

agrupados em nenhum filo e esses foram nomeados como bactérias não classificadas (NC). Estas seqüências não classificadas foram agrupadas em 14 grupos na área SAE (Figuras 7,10,16 e 17), com 20 representantes distintos, freqüência de 11,69% e índices de similaridade de 89 a 100%. A maioria desses representantes bacterianos já foi observada em trabalhos anteriores, como em solos de florestas, áreas cultivadas, ambientes poluídos (SESSITCH et al., 2001; DUNBAR et al., 2002), mas não puderam ser classificados também. Uma curiosidade foi clone nº 109 “Uncultured bacterium TK67 16S rDNA” (ver apêndice) - catalogado de águas oceânicas do Mar Mediterrâneo que estavam associados com espécies de esponjas. (HENSTCHEL et al., 2002).

Na área SFN os grupos NC 1 a NC 8 (Figuras 5,8, 9 e 13) foram agrupados com 23 representantes distintos, freqüência de 20,34% e índices de similaridade de 91 a 98%. Essas seqüências já estão catalogadas de áreas cultiváveis, solos áridos da Austrália, ambientes aquáticos, ambientes contaminados, águas oceânicas e trabalhos que não foram publicados (HUGENHOLTZ et al., 1998; NOGALES et al., 2001; DUNBAR et al., 2002; HENTSCHEL et al., 2002).

Tabela 3 – Tabela de clones distintos, não classificados (relatório Blast 06/06/2003) e suas freqüências nas bibliotecas SFN e SAE após a análise do Programa Mega.

Dominio : Bacteria	SFN Nº de clones distintos	SFN %	SAE Nº de clones distintos	SAE %
FILOS				
<i>Acidobacteria</i>	24	42,40	34	21,7
<i>Actinobacteria</i>	-----	-----	14	10,4
<i>Bacteroidetes</i>	02	6,06	03	1,20
<i>Firmicutes</i>	-----	-----	03	1,20
<i>Nitrospirae</i>	-----	-----	-----	-----
<i>Planctomycetes</i>	-----	-----	01	0,8
<i>Proteobacteria</i>	11	5,19	18	14,9
<i>Verrucomicrobia</i>	01	0,43	10	8,46
Não Classificados	23	20,34	29	11,69

Após a análise dos filogramas utilizando seqüências do Genbank de organismos já classificados pode-se observar que a área em SAE apresentou 158 seqüências bacterianas distintas, ou seja, seqüências bacterianas diferentes e a área de floresta (SFN) apresentaram 123. Na biblioteca de SFN, foram descritos 08 filos com 100 representantes distintos e 08 agrupamentos com 23 representantes que não puderam ser formalmente classificados. Por outro lado, na biblioteca SAE encontrou-se 07 filos constituídos por 138 representantes distintos e 14 agrupamentos com 20 representantes que não puderam ser classificados.

A grande maioria das bactérias da biblioteca SFN (Figura 18) pertence ao filo *Acidobacteria* (46,75%); por outro lado, na biblioteca SAE existe uma distribuição de freqüência mais homogênea, sem grande destaque para qualquer um dos filos observados. Entretanto, as bactérias pertencentes a *Acidobacteria* também foram o grupo mais freqüente encontrado (26,20%) no solo SAE.

Os filos *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycetes* e *Verrucomicrobia* se mostraram mais freqüentes na biblioteca do solo SAE (19,75%, 5,24%, 2,4% e 12,6%, respectivamente) que no solo SFN. Por outro lado, dentre os microrganismos observados no SFN, o filo *Bacteroidetes* foi mais freqüente do que no SAE (2%) (Figura 18).

Além disso, apenas no solo SFN se observou microrganismos pertencentes ao filo *Nitrospirae* e a freqüência dos microrganismos do grupo *Proteobacteria* se mostrou similar nos 2 solos, aproximadamente 20%.

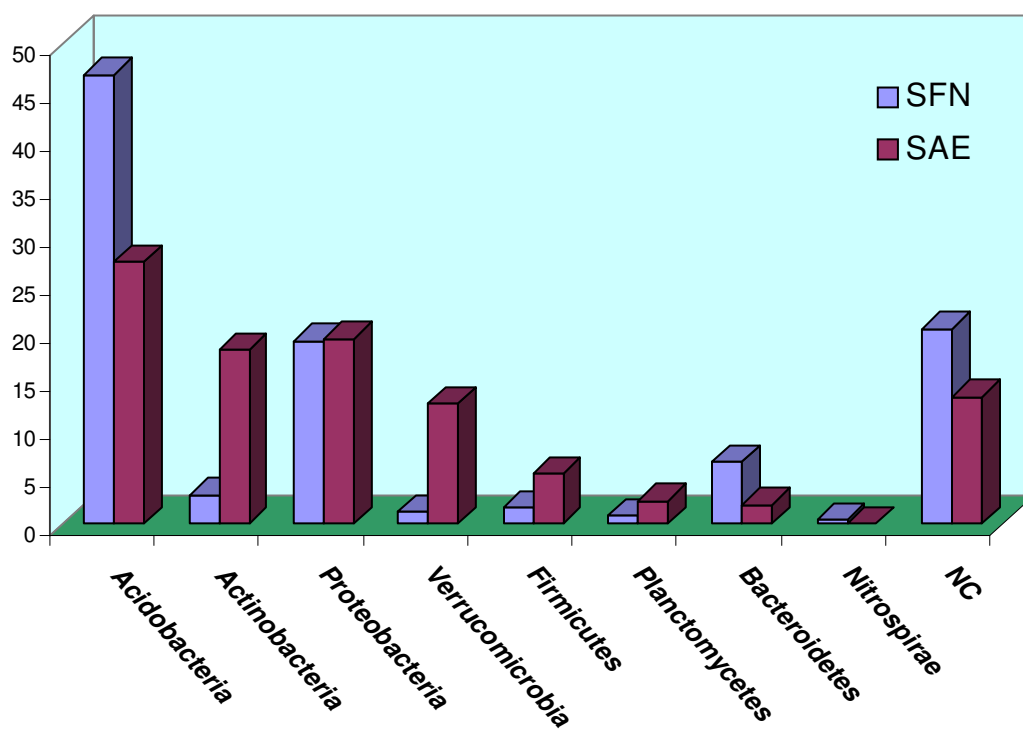


Figura 18 – Representação gráfica da distribuição das seqüências bacterianas clonadas do gene 16S rRNA dos solos SFN e SAE após realização do programa de Análise Genética de Evolução Molecular MEGA versão 2.1.

IV.1 Filo *Acidobacteria*

Diferenças significativas puderam ser observadas (Figura 18) entre as bactérias pertencentes a este filo quando se comparou a sua frequência nas duas bibliotecas estudadas SNF (46,75%) e SAE (26,20%). Além disso, pode-se observar que o filo *Acidobacteria* na biblioteca SFN (Figuras 4 e 5) apresentou frequência de 46,75% e foi formado por cinco agrupamentos de 55 clones dos 123 clones distintos observados ("bootstrap" variando de 58 a 100%). Nesse filo foi observada a presença de 30 clones que apresentavam frequência única.

Na biblioteca SAE (Figuras 6 e 7) o filo *Acidobacteria* também foi predominante, as seqüências observadas foram divididas em quatro agrupamentos, constituídos por 42 seqüências bacterianas distintas com frequência total de 26,20% ("bootstrap" de 52% a 99%). Além disso, nesta área houve a presença de 23 clones que possuíam frequência única. Sendo o solo SAE mais ácido do que o solo SFN (Tabela1) esperava-se que os números de clones observados no filo *Acidobacteria* fossem predominante em relação aos demais filos, mas ao contrário da expectativa foi observada uma distribuição mais homogênea.

Neste filo todas as bactérias acessadas pelo NCBI ainda são desconhecidas quanto às características taxômicas, uma vez que não é possível, até o momento seu cultivo. Com base nas análises do gene 16S rRNA, HIRASHI et al., (1995) propuseram que este agrupamento fosse denominado *Acidobacteria*. Embora ainda pouco conhecido este filo vem sendo encontrado em diferentes solos (HUGENHOLTZ et al., 1998; SMIT et al., 2001; DUNBAR et al., 2002). Segundo NÜSSELEIN et al., (1999) provavelmente, bactérias deste filo devem ter importância ecológica significativa, pois são encontradas em abundância nos mais diversos tipos de solos.

IV.2 Filo *Actinobacteria*

Esse filo é mais um dos grupos bacterianos que se mostraram com frequência diferenciada entre os solos estudados (Figura 18), enquanto para a biblioteca do solo SFN observou-se que apenas 3% dos clones pertenciam a esse grupo, na biblioteca SAE a frequência observada foi de aproximadamente 20%. Pelas árvores filogenéticas obtidas com as seqüências de microrganismos desse filo (Figuras 9,10 e 11), pode-se observar que este grupo também apresenta um grande número de microrganismos não cultivados e que a bactéria *Friedmanniella* sp. foi encontrada nos dois sítios em estudo. Por outro lado, no solo SAE (Fig. 10 e 11) puderam ainda ser encontrados *Conexibacter woesei* que é uma bactéria Gram negativa e foi primeiramente isolada de solo de florestas, mas também pode ser isolada de diversos ambientes. Além disso, observou-se nesse solo a presença dos *Mycobacterium moriokaense*, *Mycobacterium avium* e *Streptomyces* sp., O *Mycobacterium avium* é uma bactéria encontrada raramente em solos, agente causador de lesões em órgãos nos sistemas digestivos em suínos e aves (GARRITY et al., 2002). Por outro lado, o *Streptomyces* sp é frequentemente encontrada em solos, sendo que algumas espécies desse gênero têm como características ser fitopatígeno.

A maioria das bactérias do filo *Actinobacteria* é produtora de diversos antibióticos e por esta razão pode ter um papel importante na unidade de eucalipto para controlar a população de diversos grupos.

IV.3 Filo *Proteobacteria*

A frequência de seqüências de microrganismos pertencentes ao filo *Proteobacteria* não apresentou grandes variações dentre os solos estudados, sendo 19% para SFN e 20% para SAE (Figura 18). Pela análise dos filogramas (Figuras 12 e 13) se formaram na biblioteca SFN 03 agrupamentos de *Proteobacterias* constituídos por 29 dos 123 clones totais. Neste filo foram encontrados *Proteobacterias* de 04 classes diferentes, α -*Proteobacteria*, β - *Proteobacteria*, δ -*Proteobacteria* e γ -*Proteobacteria*. As classes formaram sub-agrupamentos com “bootstrap” de 55 a 100%. O grupo das α -*proteobacteria* compreende a maioria das bactérias não sulfurosas e não fotossintéticos. Além disso, neste trabalho observou-se bactérias importantes para o solo e que pertencem ao grupo α -*Proteobacteria*, como o *Bradyrhizobium* sp. (bactéria fixadora simbiótica de nitrogênio).

A classe β - *proteobacteria* está constituída por 10 clones divididos em 5 subgrupos e suporte de “bootstrap” de 59 a 100%. Nesse grupo foi observada a presença da bactéria da espécie *Caenibacterium thermophilum* , isolado de digestores de lodo municipal em Portugal; entretanto nesse hábitat sua fisiologia precisa ser melhor avaliada. Também foram encontrados gêneros *Chromobacterium* sp. e *Variovax* sp.

No subgrupo das γ -*Proteobacteria* encontrou-se 03 clones e suporte de “bootstrap” de 60 a 100%. No subgrupo δ -*Proteobacteria* (03 clones com “bootstrap” de 60 a 100%) só foram observadas bactérias não cultiváveis (Figura 13). Além disso, também foi observada a existência de 05 clones que não puderam ser agrupadas nas classes distintas (Figura 12), apenas consideradas como *Proteobacteria* incertas (“bootstrap” de 74 a 92%).

A biblioteca SAE (Figuras 14 e 15) possui 05 agrupamentos no filo *Proteobacteria* constituídos por 33 clones distintos, representando 04 classes diferentes. A classe α -*Proteobacteria* formada por 14 seqüências distintas (“bootstrap” de 59 a 100%) e a presença de representantes importantes como *Bradyrhizobium* sp e *Sphingopyxis chilensis*. Apenas 01 clone foi observado como pertencente à classe δ -*Proteobacteria* representado pela espécie *Stigmatella erecta*, bactéria Gram negativa,

geralmente isolado de madeiras e folhas em degradação (“bootstrap” de 99%). A classe β -*Proteobacteria* formou um subagrupamento com bootstrap de 68 a 96% constituído por 03 clones e como representante em destaque observou-se *Ralstonia taiwanesis*. A quarta classe de *Proteobacteria* observada foi a γ -*Proteobacteria* representado por 03 clones entre eles a *Moraxella oeloensis*, que é uma bactéria Gram negativa, sempre ocorrem em pares, são aeróbias e não móveis. Essa bactéria causa infecções em seres humanos no trato respiratório, no globo ocular e na pele, mas pode ser encontrada em diversos mamíferos. Esse isolado ocorre em regiões onde as condições higiênicas são desfavoráveis. Nesta biblioteca foram também observados 04 seqüências, identificadas como bactérias não cultivadas e que apesar de estarem agrupadas no filograma (“bootstrap” 53%) como *Proteobacteria*, não puderam ser incluídas em qualquer das classes desse filo.

Os resultados observados neste trabalho mostraram diferenças com os obtidos por McCAIG et al., (1999) na qual o filo *Proteobacteria* foi o mais abundante em duas amostras da rizosferas de solos com gramíneas da Escócia. Do mesmo modo os resultados observados neste trabalho são discrepantes com os apresentados por PEREIRA (2003) e VAL-MORAES (2003). Esses autores mostraram freqüência de *Proteobacteria* variáveis entre os solos cultivados e de florestas realizados no interior do Estado de São Paulo no Brasil. PEREIRA (2003) descreveu uma freqüência de 28 % de *Proteobacteria* em solo sob cultivo com rotações de cultura como tomate, milho e feijão, contrastando com a freqüência desse filo bacteriano em solo de floresta nativa 9%. Do mesmo modo VAL-MORAES (2003) verificou que o solo sob floresta nativa quando comparado com solo utilizado para cultivo de hortaliças apresentava diferenças nas freqüências de *Proteobacteria* 9 e 26%, respectivamente. Nesses três trabalhos os solos que apresentavam maior número de *Proteobacteria* eram solos submetidos a diferentes manejos agrícolas que poderiam estar interferindo nas comunidades desses microrganismos; por outro lado, solos não submetidos a qualquer tratamento apresentavam metade da freqüência observada no SFN e SAE, que são solos considerados estáveis, portanto deveriam apresentar menor número de bactérias do filo *Proteobacteria* do que aqueles solos submetidos à manipulação.

IV.4 Outros filios observados

O filo *Nitrospirae* com 01 clone distinto e 0,4% de freqüência apareceu apenas na biblioteca SFN (Figuras 9 e 18). Segundo GARRITY et al., (2002) este filo é composto por 8 espécies identificadas. Utilizando seqüenciamento do gene do 16S rRNA, ele foi encontrado em solos áridos dos Estados Unidos e em floresta nativa do Brasil sempre em baixa freqüência (DUNBAR et al., 2002; PEREIRA, 2003).

Outros microrganismos importantes identificados nos dois solos em estudo foram bactérias pertencentes aos filios *Bacteroidetes*, *Planctomycetes* e *Verrucomicrobia*. Desses representantes, (Figura 18) apenas o filo *Bacteroidetes* apresentou maior freqüência no SNF (6,50A) que no SAE (2%), os outros dois filios apareceram em maior números de clones no SAE, sendo que o filo *Verrucomicrobia* (Figura 18) mostrou-se 10 vezes mais freqüente em SAE (12,3%) do que no SFN (1,29%). Resultados semelhantes foram obtidos no trabalho desenvolvido por LEE et al., (1996). Entretanto os autores mostram que este filo representa aproximadamente de 1 a 10% da contagem microbiana do solo não cultivado da Austrália e E.U.A.

Como pode ser observado nas figuras 9, 16 e 17 o grupo de bactérias pertencentes aos filios *Verrucomicrobia* e *Bacteroidetes* são constituídos apenas por bactérias não cultivadas. Por outro lado, seqüências de bactéria cultivadas do gênero *Planctomyces* sp. foram observados nos dois solos estudados.

O filo *Firmicutes* contém 14 representantes distintos sendo 04 para o SFN (Figuras 8 e 9) com freqüência de 1.73% (Figura 18) e 10 para SAE (Figuras 16 e 17) com freqüência de 5,22%. Todas as seqüências observadas foram pertencentes ao gênero *Bacillus*, bactérias formadoras de esporos e freqüentemente encontradas em solo. Das seqüências observadas na biblioteca SAE pode-se verificar que a grande maioria delas são bactérias já identificadas ou cultivadas (Figuras 16 e 17), o mesmo ocorre com as seqüências dos clones SNF (*B.niacini*, *B. infernus* e *B. dretensis*) (figuras 8 e 9).

IV.5 Comparações com outros trabalhos

De todas as seqüências observadas nas 02 bibliotecas, apenas 23 clones foram similares em ambas áreas, sendo que a maioria pertence ao filo *Acidobacteria* (60,86%). Os clones que mais se destacaram individualmente de cada biblioteca pertencem a filos diferentes, como o clone nº.54 – “Uncultured soil bacterium clone 760 –2 16S rDNA”(ver Apêndice) , catalogado por VALINSKY et al., (2002) proveniente de um solo cultivável da Califórnia, desconhecido na primeira instância, e que neste trabalho foi agrupado no filo *Bacteroidetes* após a análise do programa Mega. Essa seqüência apresentou uma similaridade entre 94 a 96% com as depositadas no “GenBank” e 5,19% de freqüência em SFN (ver apêndice). Além disso, o clone nº 279 Agricultural soil bacterium clone SC-I-17, 16S (93–97%) com freqüência de 3,43% do total foi catalogado pela primeira vez nos solos de rizosferas de plantas transgênicas na Alemanha. O maior representante em SAE foi o clone nº 21 – “Uncultured bacterium #0649-1G9”, esse clone apresentou uma similaridade de 90 a 95% com a seqüência depositada no “GenBank”, pertence ao filo *Actinobacteria*, catálogado por HOLMES et al. (2000) e é originário de solo do deserto da Austrália, com 4,38% da freqüência do total desta área.

Outros clones também apresentaram freqüências altas como o clone nº 146 - Unidentified eubacterium from the Amazon (homologia de 89 – 95%) e nº 28 - Uncultured Green Bay ferromanganous micronodule bacterium MNF4 (homologia de 93 – 96%), com 3,26% e 2,85% de freqüência respectivamente. Esses clones foram catalogados nos solos da Floresta Amazônica e sedimentos enriquecidos com metais pesados nos Estados Unidos.

No Brasil poucos são os estudos das populações bacterianas de solos, mas BORNEMAN et al. (1996), utilizaram a técnica molecular para comparar duas áreas na região da Amazônia brasileira, a primeira coletada em área de solo floresta natural e outra em área de desmatamento, que deste 1969 se tornou pastagens de *Brachiaria humidicola*. A metodologia utilizada foi a análise da região ITS (“Intergenic Transcribe Space”) entre os genes 16S rRNA e 23S rRNA. O filo que apresentou maior freqüência (22,4%) na unidade de floresta amazônica, foi o *Firmicutes* com o *Bacillus* sp. e o

Clostridium sp como principais representantes. Comparativamente neste trabalho observou freqüência de apenas 1,71% para o solo sob Floresta Nativa (SFN) e 5% para o solo sob arboreto de eucalipto (SAE).

Os filos *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* mostraram neste trabalho freqüência de 18,90% e 1,30% respectivamente no solo SFN; por outro lado, no trabalho realizado por BORNEMAN et al. (1996) na unidade de floresta Amazônica, ambos os grupos apresentaram 12,2% de freqüência, mostrando assim a grande diferença dessas regiões com relação aos organismos do filo *Verrucomicrobia*.

Quanto à unidade desmatada estudada por BORNEMAN et al. (1996) e os grupos mais representativos foram *Proteobacteria* com 20,4%, este resultado foi que mais se aproximou com a área reflorestada estudada neste trabalho 19,52% em SAE.

A comparação entre os deste trabalho com o de BORNEMAN et al. (1996) fica limitado, pois existem diferenças significativas entre a Região Amazônica e a de Jaboticabal, mesmo que a metodologia adotada para análise tenha sido a mesma. As características dessas regiões, em relação ao nível pluviométrico, parâmetros físicos e químicos do solo, matéria orgânica são diferentes e também os oligonucleotídeos iniciadores adotados, mesmo assim os autores conseguiram diferenciar através de metodologia molecular a diversidade microbiana das duas áreas.

Em trabalho similar DUNBAR et al (2002) analisaram molecularmente quatro áreas nas comunidades “pinyon-juniper woodlands”, nesse caso, os filos mais abundantes foram os mesmos encontrados na unidade SFN, como *Acidobacteria* (50% de freqüência) e *Proteobacteria* (20% de freqüência).

O trabalho de mestrado realizado por FONSECA (1984) comparou por análises simultâneas químicas, físicas e microbiológicas solos de três unidades distintas em uma região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, solo sob Floresta Natural, de área de reflorestamento com 03 espécies diferentes de *Eucaliptus* sp. (idade aproximada 26 anos) e área com pastagem. Nessa região as características climáticas e pluviométricas são semelhantes ao do Campus de Jaboticabal e para o autor as análises da microflora por inoculação em placas de ágar, mostram que a área sob eucalipto propiciou condições mais favoráveis à atividade e quantidade de microrganismos do solo do que

na floresta natural. O índice de contagem bacteriana chegou a ser em média 2,5 vezes maior na área com eucalipto do que na floresta natural, entretanto a diversidade não foi avaliada.

IV.6 Índice de diversidade

Nesse estudo para o cálculo do índice de diversidade dos solos foi utilizado o ACE. Esse algoritmo utiliza as frequências obtidas do banco de dados meta genômica, baseado nas seqüências das espécies ≤ 10 ou baixo número de amostras para estimar riquezas de diversidade de espécies (HUGHES et al., 2001). Outro índice, ao contrário do ACE, como por exemplo, Chao1 utiliza para o cálculo de diversidade apenas frequências iguais a 1 (“singletons”) e 2 (“doubletons”).

Nos resultados obtidos nesse trabalho observou-se que para a biblioteca SAE dos 158 clones distintos apenas 121 eram “singletons” e 19 “doubletons”, os outros apresentaram frequências maiores. Do mesmo modo na biblioteca SFN dos 123 clones observados apenas 78 eram “singletons” e 23 eram “doubletons”, os outros clones apresentavam frequências diferentes. Esses resultados, portanto, indicam a utilização do ACE para o cálculo da diversidade dos microrganismos dos solos.

Os índices de diversidade encontrados neste trabalho mostraram uma maior diversidade no solo sob eucalipto de 561 OTUs (Unidade de Taxonomia Operacional) ou seqüência diferentes de bactérias, enquanto que no solo sob Floresta Nativa esse índice foi quase a metade com 288 OTUs. A diferença encontrada no índice de diversidade entre as áreas estudadas comprova que o solo sob eucalipto apresentou maior variabilidade na população, isto se deve ao fato de que a área SFN, considerado como um solo sob uma vegetação clímax e que não foi alterada pelo homem, apresentam as comunidades bacterianas mais adaptadas ao meio ambiente, ou seja, um sinergismo maior e que a área sob eucalipto passou a ser considerada como uma alteração deste ecossistema, aumentando a dinâmica entre estas comunidades.

V. CONCLUSÕES

As análises dos resultados permitiram as seguintes conclusões:

1 - A comparação das comunidades bacterianas dos solos sob floresta nativa e arboreto de eucalipto, pelo uso do DNA metagenômico do solo e PCR com os oligonucleotídeos iniciadores para a região 16S rDNA, propiciou a identificação de diversas comunidades bacterianas não cultiváveis do solo e ainda não classificadas filogeneticamente;

2 - Essa técnica molecular permitiu o estudo da diversidade das comunidades bacterianas com pequena amostra de solo quando comparada à técnica tradicional de cultivo;

3 - O agrupamento filogenético das seqüências obtidas permitiu a caracterização de várias seqüências não classificadas no banco de dados, portanto foi possível verificar diferenças entre as comunidades bacterianas existentes em um solo de mata natural e um solo sob eucalipto;

4 - Foi observado grande freqüência de microrganismos pertencentes ao filo *Acidobacteria* nos 2 solos, sendo estes a maioria das bactérias identificadas no solo sob floresta nativa;

5 - A distribuição das freqüências entre os diferentes filos foi mais homogênea no solo sob arboreto de eucalipto que no solo de floresta nativa;

6 - A comunidade de microrganismos pertencentes aos filos *Actinobacteria* e *Verrucomicrobia* foi maior no solo sob arboreto de eucalipto;

7 - A área sob arboreto eucalipto apresentou maior diversidade bacteriana através de análise molecular, demonstrando que o plantio de eucalipto não prejudica a comunidade bacteriana de um solo;

8 - O plantio de eucalipto em solos degradados pode auxiliar na recuperação dos mesmos quanto ao desenvolvimento de diferentes e variadas populações bacterianas.

VI. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Review**, Washington, v. 59, p 143-169, 1995.

ASTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p. 3389-402, 1997.

ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial ecology: Historical development. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. **Microbial ecology**. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, 1998. p. 2-26 a.

ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial evolution and Biodiversity. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology**. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, 1998. p. 27-57 b.

ATLAS, M.; BARTHA, R. Microorganisms in their natural habitats: air, water, and soil microbiology. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology**. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, 1998. p. 333-373. c.

BORNEMAN, J. et al. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n. 6, p. 935-43, 1996.

BORNEMAN, J. et al. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n. 7, p. 2647-53, 1997.

CANHOS, V.P. et al. Diversidade no domínio bactéria. In: CANHOS, V.P. et al. **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. São Paulo: FAPESP, 1997. p.1-13.

CHO, J.C.; KIM, S.J. Increase in Bacterial Community Diversity in Subsurface Aquifers Receiving Livestock Wastewater Input. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 956-965, 2000.

CULLEN, D.W.; HIRSCH, P.R. Simple and rapid method for direct extration of microbial DNA from soil for PCR. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, vol. 30, nº 8/9, pp. 983-993, 1998.

DOJKA, M.A. Microbial diversity in a Hydrocarbon-and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.10, p. 3869-77, 1998.

DROZDOWICZ, A. Bactérias de solo. In: VARGAS, M.A.T.; Hungria, M. **Biologia dos solos dos cerrados** .Planaltina: Embrapa/CPAC, 1997. p. 17 –66.

DUNBAR, J. et al. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n. 4, p. 1662-9, 1999.

DUNBAR, J. et al. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.06, p.3035-45, 2002.

FONSECA, S. **Propriedades físicas, químicas e microbiológicas de um latossolo vermelho amarelo sob eucalipto, mata natural e pastagem**. 78f. 1984. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa , 1984.

FURLONG, M. A. et al. Molecular and culture-based analyses of Prokaryotic communities from an agricultural soil and the Burrows and Casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n. 3, p.1265-79, 2002.

GARRITY,G.M; WINTERS, M.; SEARLES, D.B. **Taxonomic outline of procaryotic genera Bergey's Manual^R of systematic bacteriology**. 2 ed. NewYork: Springer-Verlag, NewYork,Inc, 2002.Disponível em: [http://dx. Doi.org/10.1007/bergeyoutline200210](http://dx.Doi.org/10.1007/bergeyoutline200210) Acesso em: 09/09/2003.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A grafical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Toronto, v.8, p.195-202, 1998.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**,Oxford, n. 41, p.95–98, 1999.

HENTSCHEL, U. et al. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.09, p. 4431-40, 2002

HIGA, A. R.; HIGA R.C.V.; IN: GALVÃO, A.P.M. **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais**. Colombo: Ed. Embrapa, 2000, p. 101-124.

HIGA, A. R.; RESENDE, M.D. V.; SOUZA, S.M. Programa de melhoramento genético de *Eucaliptus* no Brasil. In: SETZ, R. A; REISMAN, C. B.; CARNEIRO, J.G.A; MALINOUSKI, J.R.; SOARES, R.V. **O desafio das florestas Neotropicais**. Curitiba: Ed. Universidade Federal do Paraná, 1991. p. 86-100.

HILL, T. C. J.; WALSH, K. A.; HARRIS, J. A.; MOFFETT, B. F. Using ecological diversity measures with bacterial communities. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.43, p.1-11, 2003.

HIRASHI, A. et al. Phylogenetic position of the menaquinone-containing acidophilic chemoorganotroph *Acidobacterium capsulatum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.132, p. 91-94, 1995.

HOLMES, A.J. et al. Diverse, yet-to-be-cultured members of the *Rubrobacter* subdivision of the *Actinobacteria* are widespread in Australian arid soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.33, p.111-20, 2000.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 4765-74, 1998.

HUGHES, J. B. et al. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v 67, p.4399-06, 2001.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In: JUKES, T. H.; CANTOR, C. R **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969. p.21-132.

KENT, A. D; TRIPLETT, E. W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.56, p. 211-36, 2002.

KUMAR, S. et al. Mega2: molecular evolutionary genetics analysis software **Bioinformatics**, Oxford, v.17, n.12, p. 1244-45, 2001.

KUSKE, C. R. et al. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many Geographic regions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.09, p. 3614-21,1997.

LAYTON, A. C. et al. Quantification of *Hyphomicrobium* populations in activated sludge from an industrial wastewater treatment system as determined by 16S rDNA analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.3, p. 1167-74, 2000.

LEE, S.Y. et al. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p.3787-3793,1996.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Estimativas de biodiversidade brasileira. In: LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P., (Ed.). **Biodiversidade Brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**, São Paulo: Contexto, 2002. p. 91.

LILES, M. et al. A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 69, n.5,s p. 2684-2691, 2001.

LIMA, V.P. Solo e eucalipto. In: LIMA, V.P. **Impacto ambiental do eucalipto**. 2 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1996. p. 14 –168.

LUDWIG, W. et al. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam, v.153, n.1, p. 181-90, 1997.

MACRAE, A. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, n.31, p. 77-82, 2000.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K.V.; GOUD, S.J. Reino Bactéria (Prokaryotae, Procarutar, Monera). In: MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K.V.; GOUD, S.J. **Um guia ilustrado dos filos da vida na Terra**. 3. ed. New York: W.H.Freeman, 1998. p.39-106.

MARTEINSSON, V. T. et al. Phylogenetic diversity analysis of subterranean hot springs in Iceland. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n. 9, p. 4242-48, 2001.

McCAIG, A.; GLOVER, A.; PROSSER J.I. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.04, p. 1721-30, 1999.

NOGALES, B. et al. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n. 4, p. 1874-1884, 2001.

NÜSSLEIN, K.; TIEDJE, J.M. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n. 8, p. 3622-26, 1999.

PEREIRA, R.M. **Diversidade Bacteriana de um Latossolo sob cultivo intensivo e floresta através da análise metagenômica**, 75f. 2003. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

PINTO, C. R. O; NAHAS, E. Atividade e população microbiana envolvida nas transformações do enxofre em solos com diferentes vegetações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.12, p.1751-1756, 2002.

RONDON, M. et al. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n. 6, p. 2541-47, 2000.

SAIT, M.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. **Environmental Microbiology**, Osnabückv, v.4, n.11, p. 654-66, 2002.

SAITOU, N.; NEI M. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution**, Chicago, v.4, p. 406-25, 1987.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATS T. Plasmid Vectors. In: SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATS T. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 p.1.1-10.

SANDAA, R.A. et al. Rapid methods for fluorometric quantification of DNA in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 30, n. 2, p. 265-268, 1998.

SEBAT, J.L.; COLWELL, F.S.; CRAWFORD, R.L. Metagenomic Profiling: Microarray analysis of an environmental genomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.08, p. 4927-34, 2003.

SEKIGUCHI, H. et al. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.10, p. 5142-50, 2002.

SESSITSCH, A. et al. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n. 9, p. 4215-24, 2001.

SMIT, E. et al. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular biology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n. 5, p. 2284-91, 2001.

STALEY, J.T.; KONOPLA, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, n. 39, p. 321-346, 1985.

STEIN, L. Y. et al. Bacterial and archaeal populations associated with freshwater ferromanganese micronodules and sediments. **Environmental Microbiology**, Osnabück, v.03, n.01, p. 10-18, 2001.

TERZAGHI, E.; O'HARA, M., Microbial plasticity. The relevance to microbial ecology. **Advances Microbial Ecology**, New York, v.11, p. 431-60, 1990.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, n. 25, p. 4876-4882, 1997.

VALADARES-INGLIS, M.C.; MELO, I. S. Métodos de extração de DNA e sua aplicação em estudos genéticos e ecológicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa/CNPMA, 1998. p. 187-204.

VALINSKY, L. et al. Analysis of bacterial community composition by oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.007, p. 3243-50, 2002.

VAL-MORAES, S.P. **Avaliação metagenômica de microrganismos de solos supressivo e condutor a *Rhizoctonia solani***, 89 p. 2003. Dissertação (Mestrado em

Microbiologia) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

WARD, B.B. How many species of prokaryotes are there. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.99, n.16, p.10234-236, 2003.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D.C.; WIBE, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** , Washington, v.95, p. 6578-83, 1998.

ZHOU, J. et al. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 316-22, 1996.

APÊNDICE

Tabela 1. Resultados dos clones com seqüências parciais do gene 16S rRNA na biblioteca SAE, com seqüências depositados no NCBI, utilizando programa BLAST em 06/06/2003 e o agrupamento filogenético através do programa MEGA 2.1. NDC corresponde ao nº de clones distintos, NB ao numeração adotado pelo resultado do BLAST, S a similaridade do clone ao Blast, F indica nº clones observados.

NDC	N.B	Nº acesso NCBI	Nome do clone	Agrupamento Filo	S (%)	F	%
1	1	AB021194.1	<i>Bacillus niacini</i>	<i>Firmicutes</i>	98-99	2	0,816
2	4	AB087718	<i>Rhodopseudomonas cryptolactis</i>	<i>Proteobacteria</i>	95	1	0,408
3	5	AF009975.1	Unidentified eubacterium LD29	<i>Verrucomicrobia</i>	90-91	2	0,816
4	6	AF010015.1	Uncultured eubacterium	<i>Acidobacteria</i>	95	1	0,408
5	7	AF010074.1	Uncultured eubacterium	<i>Actinobacteria</i>	97	1	0,408
6	8	AF010096.1	Uncultured eubacterium	NC5	97	1	0,408
7	9	AF010100.1	Uncultured eubacterium	<i>Acidobacteria</i>	91	2	0,816
8	10	AF013515.1	Uncultivated soil bacterium clone C002	<i>Acidobacteria</i>	93-96	2	0,816
9	11	AF050548.1	Uncultured eubacterium WCHA2-13	<i>Acidobacteria</i>	92	2	0,816
10	12	AF078399.1	Grassland soil clone sl2_715	<i>Acidobacteria</i>	95	1	0,408
11	13	AF084529.1	<i>Friedmanniella capsulata</i>	<i>Actinobacteria</i>	95	1	0,408

Continuação Tabela 1							
12	14	AF131571.1	<i>Streptomyces</i> sp. IM-7204	<i>Actinobacteria</i>	98	1	0,408
13	15	AF131641.1	<i>Thermomonosporaceae</i> str. IM-6903	<i>Actinobacteria</i>	93	1	0,408
14	16	AF145825.1	Metal-contaminated soil clone K20-25	<i>Actinobacteria</i>	91	1	0,408
15	17	AF145843.1	Metal-contaminated soil clone K20-48	<i>Acidobacteria</i>	92-94	4	3,632
16	18	AF145871.1	Metal-contaminated soil clone K20-83	<i>Acidobacteria</i>	97	1	0,408
17	19	AF154097.1	Uncultured hydrocarbon seep bacterium BPC087	<i>Proteobacteria</i>	96	1	0,408
18	20	AF221062.1	<i>Bacillus jeotgali</i>	<i>Firmicutes</i>	93	1	0,408
19	21	AF234119.1	Uncultured bacterium #0649-1G9	<i>Actinobacteria</i>	90-95	11	4,489
20	22	AF234728.1	Uncultured sludge bacterium A20	<i>Proteobacteria</i>	90	1	0,408
21	24	AF245036.1	Uncultured bacterium 17F9	<i>Acidobacteria</i>	89	1	0,408
22	25	AF255626.1	Uncultured bacterium	<i>Acidobacteria</i>	89	1	0,408
23	26	AF271309.1	Uncultured planctomycete clone1	<i>Planctomycete</i>	96	1	0,408
24	27	AF271313.1	Uncultured planctomycete clone15	<i>Planctomycete</i>	95	1	0,408
25	28	AF292996.1	Uncultured Green Bay ferromanganous micronodule bacterium MNF4	<i>Proteobacteria</i>	93-96	7	2,856
26	29	AF300324.1	<i>Ralstonia taiwanensis</i>	<i>Proteobacteria</i>	94	1	0,408
27	30	AF314419.1	Uncultured bacterium PHOS-HE21	NC10	89	1	0,408

Continuação Tabela 1							
28	31	AF337820.1	Uncultured copper smeltery bacterium D83	<i>Planctomycete</i>	95	1	0,408
29	32	AF337872.1	Uncultured gold mine bacterium D49	<i>Proteobacteria</i>	92	1	0,408
30	33	AF367204.1	<i>Sphingopyxis chilensis</i>	<i>Proteobacteria</i>	95	1	0,408
31	34	AF388316.1	Uncultured bacterium clone Ac33	<i>Actinobacteria</i>	92	1	0,408
32	35	AF388332.1	Uncultured bacterium clone Ac71	<i>Acidobacteria</i>	96	1	0,408
33	36	AF388343.1	Uncultured bacterium clone Ac18	NC4	97	1	0,408
34	37	AF388355.1	Uncultured bacterium clone Ac1	<i>Acidobacteria</i>	98	1	0,408
35	38	AF388362.1	Uncultured bacterium clone Ac57	<i>Verrucomicrobia</i>	98	2	0,816
36	39	AF392726.1	Uncultured bacterium clone CDF7	<i>Acidobacteria</i>	96	1	0,408
37	40	AF392728.1	Uncultured bacterium clone CDC3	NC3	94	1	0,408
38	41	AF395072.1	Uncultured bacterium clone 16S1	<i>Verrucomicrobia</i>	88	1	0,408
39	42	AF403191.1	Uncultured bacterium clone cvf122212	<i>Verrucomicrobia</i>	94	1	0,408
40	43	AF407198.1	Uncultured bacterium clone GIF7	<i>Proteobacteria</i>	91-97	6	2,448
41	44	AF407700.1	Uncultured bacterium clone G13	<i>Acidobacteria</i>	93-94	2	0,816
42	46	AF410479.1	<i>Mycobacterium avium</i> Myc373	<i>Actinobacteria</i>	98	1	0,408
43	47	AF422588.1	Uncultured bacterium clone t013	<i>Acidobacteria</i>	98	1	0,408

44	48	AF422685.1	Uncultured bacterium clone d161R	<i>Proteobacteria</i>	98	1	0,408
45	49	AF423204.1	Uncultured soil bacterium clone 10-1	<i>Firmicutes</i>	96	2	0,816
46	50	AF423221.1	Uncultured soil bacterium clone 1316-2	<i>Actinobacteria</i>	94	1	0,408
47	51	AF423235.1	Uncultured soil bacterium clone 192-2	<i>Acidobacteria</i>	96	1	0,408
48	52	AF423273.1	Uncultured soil bacterium clone 528-1	<i>Actinobacteria</i>	93-96	2	0,816
49	53	AF423284.1	Uncultured soil bacterium clone 646-2	<i>Proteobacteria</i>	95	1	0,408
50	54	AF423292.1	Uncultured soil bacterium clone 760-2	<i>Bacteroidetes</i>	94	1	0,408
51	55	AF423293.1	Uncultured soil bacterium clone 768-2	<i>Proteobacteria</i>	94	1	0,408
52	56	AF424152.1	Uncultured gamma proteobacterium MERTZ OCM 35	<i>Proteobacteria</i>	93	1	0,408
53	57	AF428894.1	Uncultured bacterium clone CR98-35-12	<i>Bacteroidetes</i>	97	1	0,408
54	58	AF429093.1	Uncultured bacterium clone CR99-7-59	<i>Verrucomicrobia</i>	91-94	3	1,224
55	59	AF429138.1	Uncultured bacterium clone CR99-24-28	<i>Proteobacteria</i>	99	1	0,408
56	60	AF432660.1	Uncultured bacterium clone SMW4.77WL	<i>Proteobacteria</i>	98	1	0,408
57	61	AF432679.1	Uncultured bacterium clone NMS8.79WL	NC7	90	1	0,408
58	62	AF432687.1	Uncultured bacterium clone SMS9.15WL	NC6	95	1	0,408
59	63	AF433165.1	<i>Paenibacillus hongkongensis</i>	<i>Firmicutes</i>	93	1	0,408
60	64	AF445103.1	Uncultured bacterium	<i>Acidobacteria</i>	93	1	0,408

Continuação Tabela 1							
61	65	AF445116.1	Uncultured bacterium clone Tc52	<i>Acidobacteria</i>	95	1	0,408
62	66	AF445143.1	Uncultured bacterium clone Tc84	<i>Verrucomicrobia</i>	94-96	2	0,816
63	67	AF445114.1	Uncultured bacterium clone Tc88	<i>Proteobacteria</i>	91	1	0,408
64	68	AF445157.1	Uncultured bacterium clone Tc100	<i>Verrucomicrobia</i>	94	1	0,408
65	69	AF454303.1	Uncultured actinobacterium clone ML316M-15	<i>Actinobacteria</i>	97	1	0,408
66	70	AF465658.1	Uncultured Acidobacterium group bacterium YNPRH5A	<i>Acidobacteria</i>	90	1	0,408
67	71	AF498689.1	Bacterium Ellin307	<i>Proteobacteria</i>	95	1	0,408
68	72	AF498705.1	Bacterium Ellin323	<i>Acidobacteria</i>	92	2	0,816
69	73	AF498708.1	Bacterium Ellin326	<i>Acidobacteria</i>	94	1	0,408
70	74	AF498709.1	Bacterium Ellin327	<i>Acidobacteria</i>	92	1	0,408
71	75	AF507394.1	Uncultured soil bacterium clone C086	<i>Actinobacteria</i>	93	1	0,408
72	76	Af507497.1	Uncultured soil clone S0113	NC14	91	1	0,408
73	77	AF507507.1	Uncultured soil bacterium clone S0138	N14	89	1	0,408
74	78	AF507510.1	Uncultured soil bacterium clone S0142	N14	95	1	0,408
75	79	AF507666.1	Uncultured soil bacterium clone C1151	<i>Verrucomicrobia</i>	93	1	0,408
76	80	AF507780.1	Uncultured soil bacterium clone S1203	<i>Verrucomicrobia</i>	94-95	2	0,816

Continuação Tabela 1							
77	81	AF523989.1	Uncultured bacterium clone FW3	<i>Acidobacteria</i>	93	1	0,408
78	82	AJ006010.1	Unidentified eubacterium clone TBS27	<i>Proteobacteria</i>	95	1	0,408
79	83	AJ231192.1	Planctomycete str. 394	<i>Planctomycetes</i>	92	1	0,408
80	84	AJ232817.1	Unidentified eubacterium clone LBS14	<i>Proteobacteria</i>	91-98	2	0,816
81	85	AJ232839.1	Unidentified eubacterium clone LRS13	<i>Acidobacteria</i>	96	1	0,408
82	86	AJ232849.1	Unidentified eubacterium LRS22	<i>Actinobacteria</i>	97	1	0,408
83	87	AJ232839.1	Unidentified eubacterium clone LRE13	<i>Proteobacteria</i>	93	1	0,408
84	88	AJ233933.1	<i>Stigmatella erecta</i>	<i>Proteobacteria</i>	93	1	0,408
85	89	AJ244311.1	Uncultured bacterium Riz6I	<i>Acidobacteria</i>	94-95	2	0,816
86	90	AJ244353.1	Uncultured bacterium Riz1077	<i>Acidobacteria</i>	97	1	0,408
87	91	AJ252616.1	Agricultural soil bacterium SC-I-13	<i>Acidobacteria</i>	95	1	0,408
88	92	AJ252649.1	Agricultural soil bacterium SC-I-68	<i>Acidobacteria</i>	90	1	0,408
89	93	AJ252662.1	Agricultural soil bacterium SC-I-86	<i>Acidobacteria</i>	95	1	0,408
90	94	AJ252667.1	Agricultural soil bacterium SC-I-92	<i>Actinobacteria</i>	85-96	5	2,04
91	95	AJ252684.1	Rhizosphere soil bacterium clone RSC-II-52	NC5	94-96	2	0,816
92	96	AJ252685.1	Rhizosphere soil bacterium RSC-II-54	NC7	95	1	0,408

Continuação Tabela 1						
93	97	AJ276809.1	<i>Bacillus</i> sp. LMG 19415	<i>Firmicutes</i>	96	2 0,816
94	98	AJ292571.1	Uncultured eubacterium WD205	<i>Actinobacteria</i>	93	1 0,408
95	99	AJ292577.1	Uncultured eubacterium WD226	<i>Acidobacteria</i>	97	1 0,408
96	100	AJ292578.1	Uncultured eubacterium WD228	NC9	100	1 0,408
97	101	AJ292580.1	Uncultured eubacterium WD244	NC1	91-95	3 1,224
98	102	AJ292581.1	Uncultured eubacterium WD247	NC8	99	1 0,408
99	103	AJ292585.1	Uncultured eubacterium WD264	NC1	93	1 0,408
100	104	AJ292775.1	Uncultured eubacterium WR8124	<i>Acidobacteria</i>	96	1 0,408
101	105	AJ296625.1	Uncultured bacterium GR-296.II.7	NC12	92-95	2 0,816
102	106	AJ308373.1	Marine psychrotrophic bacterium MstK25	<i>Proteobacteria</i>	88	1 0,408
103	107	AJ318111.1	Uncultured alpha proteobacterium clone B1ci23	<i>Proteobacteria</i>	96	1 0,408
104	108	AJ318121.1	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone B1fci37	<i>Bacteroidetes</i>	90	1 0,408
105	110	AJ429044.1	<i>Mycobacterium moriokaense</i> DSM 44221T	<i>Actinobacteria</i>	97	1 0,408
106	111	AJ440237.1	<i>Conexibacter woesei</i> DSM 14684T	<i>Actinobacteria</i>	94	1 0,408
107	112	AY037648.1	Uncultured soil bacterium clone S144	<i>Actinobacteria</i>	94-97	4 3,632
108	113	AY037684.1	Uncultured earthworm cast bacterium clone	<i>Actinobacteria</i>	97	1 0,408

Continuação Tabela 1							
109	114	AY037723.1	Uncultured earthworm cast bacterium clone C075	<i>Actinobacteria</i>	97	1	0,408
110	115	AY037740.1	Uncultured earthworm cast bacterium clone C138	<i>Actinobacteria</i>	95-97	4	3,632
111	116	AY037745.1	Uncultured earthworm cast bacterium clone C143	NC5	99	1	0,408
112	119	AY039015.1	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 3259	<i>Proteobacteria</i>	96	1	0,408
113	120	AY039016.1	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 3260	<i>Proteobacteria</i>	96	1	0,408
114	121	AY043085.1	<i>Bacillus benzoeveran</i>	<i>Firmicutes</i>	98	1	0,408
115	122	AY043376.1	<i>Moraxella osloensi</i>	<i>Proteobacteria</i>	100	1	0,408
116	123	AY043898.1	Uncultured actinobacterium clone SMS9.137WL	<i>Actinobacteria</i>	92	1	0,408
117	124	AY043928.1	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone SMW4.33WL	<i>Verrucomicrobia</i>	94	1	0,408
118	125	AY043947.1	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone SMS9.68WL	<i>Verrucomicrobia</i>	94	1	0,408
119	126	AY043950.1	Uncultured CFB group bacterium clone SMW4.2WL	<i>Bacteroidetes</i>	95	1	0,408
120	127	AY043958.1	Uncultured division TM6 bacterium clone NMW3.210WL	<i>Actinobacteria</i>	91	1	0,408
121	128	AY095392.1	Uncultured yard-trimming-compost bacterium clone S-20	<i>Proteobacteria</i>	90	1	0,408
122	129	AY095431.1	Uncultured yard-trimming-compost bacterium 69	NC2	96	1	0,408
123	130	AY100535.1	Uncultured bacterium clone cvf70163	<i>Actinobacteria</i>	92	1	0,408
124	131	AY100578.1	Uncultured bacterium clone cvf6104	<i>Bacteroidetes</i>	94	1	0,408

Continuação Tabela 1							
125	132	AY100582.1	Uncultured bacterium clone cvf7013	<i>Proteobacteria</i>	95	1	0,408
126	133	AY102909.1	Uncultured bacterium clone BCM3S-34B	<i>Proteobacteria</i>	97-98	2	0,816
127	134	AY102911.1	Uncultured bacterium clone BCM3S-5B	<i>Proteobacteria</i>	97	1	0,408
128	135	AY131222.1	<i>Bacillus</i> sp. Fa29	<i>Firmicutes</i>	93	1	0,408
129	136	AY135893.1	Uncultured bacterium clone SG2-1	NC11	89	1	0,408
130	137	D78471.1	<i>Paenibacillus kobensis</i>	<i>Firmicutes</i>	95	1	0,408
131	138	L10949.1	Marine Eubacterial sp	<i>Proteobacteria</i>	89	1	0,408
132	141	U42876.1	Unidentified soil organism R6-27	<i>Acidobacteria</i>	86	1	0,408
133	142	U51864.1	Unidentified eubacterium EA25	<i>Verrucomicrobia</i>	95-97	5	2,04
134	143	U68615.1	Unidentified eubacterium from the Amazon	<i>Proteobacteria</i>	96-99	3	1,224
135	145	U68651.1	Unidentified eubacterium from the Amazon	<i>Actinobacteria</i>	96	1	0,408
136	146	U68652.1	Unidentified eubacterium from the Amazon	<i>Verrucomicrobia</i>	89-95	8	3,264
137	147	U68654.1	Unidentified eubacterium from the Amazon	<i>Acidobacteria</i>	97	1	0,408
138	148	U68687.1	Uncultured bacterium P71 from the Amazon 16S	<i>Verrucomicrobia</i>	96-99	1	0,408
139	149	X64381.1	Bacterium (soil clone MC17)	NC13	91-97	6	2,448
140	150	X64382.1	Bacterium (soil clone MC15)	<i>Planctomycetes</i>	94	1	0,408

Continuação Tabela 1							
141	151	X68463.1	Unknown Actinomycete (MC22)	<i>Actinobacteria</i>	93	1	0,408
142	152	X68467.1	Unknown Actinomycete (MC 9)	<i>Actinobacteria</i>	94	1	0,408
143	153	X68468.1	Unknown Actinomycete (MC 26)	<i>Actinobacteria</i>	93	1	0,408
144	154	X68471.1	Unknown Proteobacterium, alpha-1 subclass (MC 106)	<i>Proteobacteria</i>	96	1	0,408
145	155	X81951.1	<i>Planctomyces</i> sp	<i>Planctomycetes</i>	95	1	0,408
146	156	Y07580.1	Uncultured soil bacterium clone 192-2	<i>Firmicutes</i>	97	1	0,408
147	157	Y07584.1	Uncultured bacterium clone DA026	<i>Firmicutes</i>	97	1	0,408
148	159	Y12598.1	unidentified bacterium clone DA122	<i>Proteobacteria</i>	95-97	3	1,224
149	160	Z95707.1	Bacteria (clone 11-14).	<i>Acidobacteria</i>	89-94	3	1,224
150	161	Z95710.1	Bacterial (clone 32-10)	<i>Acidobacteria</i>	94-96	4	3,632
151	162	Z95714.1	Bacterial (clone 32-21).	<i>Acidobacteria</i>	93-97	5	2,04
152	163	Z95720.1	Bacterial (clone RB30).	<i>Acidobacteria</i>	94-95	2	0,816
153	164	Z95727.1	Bacterial species (clone ii3-7).	<i>Acidobacteria</i>	86	1	0,408
154	165	Z95728.1	Bacterial species (clone iii1-15)	<i>Acidobacteria</i>	94-97	3	1,224
155	166	Z95730.1	Bacterial species (clone iii3-16)	<i>Acidobacteria</i>	95	1	0,408
156	167	Z95731.1	Bacterial species clone iii3-7	<i>Acidobacteria</i>	95	3	1,224

Continuação Tabela 1							
157	168	Z95732.1	Bacterial species KB 2426	<i>Acidobacteria</i>	94	1	0,408
158	169	Z95737.1	Bacterial species clone mb3429	<i>Acidobacteria</i>	94	1	0,408

Tabela 2. Resultados dos clones com seqüências parciais do gene 16S rRNA na biblioteca SFN, com seqüências depositados no NCBI, utilizando programa BLAST em 06/06/2003 e o agrupamento filogenético através do programa MEGA 2.1. NDC corresponde ao nº de clones distintos, NB ao numeração adotado pelo resultado do BLAST, S a similaridade do clone ao Blast, F indica nº clones observados.

NDC	NB	Nº de acesso NCBI	Nome do clone	Agrupamento DO FILO	S (%)	F	(%)
01	201	AB015255.1	Unidentified gamma proteobacteriaJTB256	<i>Proteobacteria</i>	90	01	0,429
02	202	AB017487.1	<i>Chromobacterium</i> sp.	<i>Proteobacteria</i>	91-92	02	0,858
03	01	AB021194.1	<i>Bacillus niacini</i>	<i>Firmicutes</i>	96	01	0,429
04	204	AB075095.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:KSS10	<i>Proteobacteria</i>	96	01	0,429
05	205	AF010066.1	Unidentified eubacterium	NC7	89	01	0,429
06	08	AF010096.1	Unidentified eubact.. 16S ribosomal	NC7	95-97	02	0,858
07	10	AF013515.1	Uncultivated soil bacterium clone C002	<i>Acidobacteria</i>	96	01	0,429
08	208	AF013527.1	Uncultivated soil bacterium clone C028	<i>Acidobacteria</i>	89-90	02	0,858

Continuação Tabela 2							
09	13	AF084529.1	<i>Friedmanniella capsulata</i>	<i>Actinobacteria</i>	96	01	0,429
10	211	AF145824.1	Metal-contaminated soil clone K20-21	<i>Proteobacteria</i>	96	01	0,429
11	213	AF175634.1	Uncultured eubacterium WJGRT-116	NC7	89-92	03	1,287
12	214	AF186413.1	Uncultured sponge symbiont PAUC37	NC1	91-96	04	1,716
13	21	AF234119.1	Uncultured bacterium #0649-1G9	<i>Actinobacteria</i>	93-98	03	1,287
14	216	AF234724.1	Uncultured sludge bacterium A39	<i>Proteobacteria</i>	97	01	0,429
15	24	AF245036.1	Uncultured bacterium 17F9	<i>Acidobacteria</i>	96	01	0,429
16	218	AF268993.1	Uncultured bacterium SBRH63	NC2	93	01	0,429
17	219	AF269000.1	Uncultured bacterium SBR2013	NC6	94-95	03	1,287
18	28	AF292996.1	Uncultured Green Bay MNF4	<i>Proteobacteria</i>	94-97	03	1,287
19	221	AF292999.1	Uncultured Green Bay MND8	<i>Proteobacteria</i>	92	01	0,429
20	222	AF293006.1	Uncultured Green Bay ferromanganous micronodule bacterium MND1	<i>Proteobacteria</i>	95-96	02	0,858
21	224	AF332298.1	Uncultured bacterium T26-8	NC5	94	01	0,429
22	225	AF332348.1	Uncultured bacterium C26-18 16S	<i>Acidobacteria</i>	86-96	02	0,858
23	226	AF337850.1	Uncultured copper smeltery bact. D99	<i>Acidobacteria</i>	92	01	0,429

Continuação Tabela 2							
24	227	AF358017.1	Uncultured bacterium L013.3	Proteobacteria	97	01	0,429
25	228	AF361216.1	Uncultured actinomycete SUBT-5	Actinobacteria	90	01	0,429
26	229	AF371837.1	Uncultured bacterium p-2117-s959-2	NC7	95	01	0,429
27	230	AF388312.1	Uncultured bacterium clone Ac89 16S	Proteobacteria	94-97	02	0,858
28	233	AF388350.1	Uncultured bacterium clone Ac74 16S	Acidobacteria	94-95	03	1,287
29	234	AF388354.1	Uncultured bacterium clone Ac62 16S	Acidobacteria	99	01	0,429
30	235	AF392686.1	Uncultured bacterium clone CBD3 16S	NC7	93	01	0,429
31	236	AF392737.1	Uncultured bacterium clone CBB2 16S	Acidobacteria	95	01	0,429
32	47	AF422588.1	Uncultured bacterium clone t013 16S	Acidobacteria	86-97	06	2,575
33	239	AF422590.1	Uncultured bacterium clone t015 16S	NC7	94	01	0,429
34	240	AF422593.1	Uncultured bacterium clone t019 16S	Acidobacteria	95	01	0,429
35	241	AF422610.1	Uncultured bacterium clone t040 16S	NC4	98	01	0,429
36	242	AF423222.1	Uncultured soil bacterium 1326-2 16S	Proteobacteria	95	01	0,429
37	54	AF423292.1	Uncultured soil bacterium 760-2 16S	Bacteroidetes	94-96	12	5,150
38	244	AF424280.1	Uncultured MERTZ_OCM_183 16S	Proteobacteria	93-94	03	1,287
39	247	AF429015.1	Uncultured bacterium CR99-35-57 16S	Bacteroidetes	90-93	02	0,858

Continuação Tabela 2							
40	248	AF429055.1	Uncultured bacterium CR99-7-21 16S	<i>Verrucomicrobia</i>	94	01	0,429
41	249	AF431223.1	Uncultured beta proteobacterium N11.99WL 16S	<i>Proteobacteria</i>	93	01	0,429
42	250	AF431253.1	Uncultured beta proteobacterium clone N27.100SM 16S	<i>Proteobacteria</i>	95	01	0,429
43	251	AF431409.1	Uncultured Acidobacterium group bacterium clone N11.137WL 16S	<i>Acidobacteria</i>	96	01	0,429
44	252	AF431481.1	Uncultured Acidobacterium group bacterium clone C46.15PG 16S	<i>Acidobacteria</i>	93-95	06	2,575
45	253	AF431482.1	Uncultured Acidobacterium group bacterium clone C46.25PG 16S	<i>Acidobacteria</i>	94	01	0,429
46	254	AF432686.1	Uncultured bacterium clone SMS9.14WL 16S	NC7	87-96	02	0,858
47	255	AF432790.1	Uncultured bacterium clone N14.25WL 16S	NC7	93-94	03	1,287
48	256	AF445089.1	Uncultured bacterium clone Tc7 16S	<i>Acidobacteria</i>	95	01	0,429
49	258	AF445152.1	Uncultured bacterium clone Tc95 16S	NC9	91	01	0,429
50	260	AF507380.1	Uncultured soil bacterium C0124 16S	<i>Acidobacteria</i>	93	01	0,429
51	261	AF507417.1	Uncultured soil bacterium clone C081 16S	<i>Acidobacteria</i>	94	01	0,429
52	262	AF507431.1	Uncultured soil bacterium clone C0114 16S	<i>Acidobacteria</i>	95	01	0,429

Continuação Tabela 2							
53	264	AF507679.1	Uncultured soil bacterium clone C06 16S	<i>Acidobacteria</i>	93	01	0,429
54	265	AF507701.1	Uncultured soil bacterium clone C0108 16S	<i>Proteobacteria</i>	91	01	0,429
55	266	AF507726.1	Uncultured soil bacterium clone S134 16S	NC2	96-97	03	1,287
56	267	AF507739.1	Uncultured soil bacterium clone S171 16S	<i>Verrucomicrobia</i>	98	01	0,429
57	268	AF507743.1	Uncultured soil bacterium clone S175 16S	<i>Proteobacteria</i>	97	01	0,429
58	269	AF507766.1	Uncultured soil bacterium clone S1154 16S	NC1	93	01	0,429
59	270	AF513100.1	Uncultured bacterium clone 62 16S	<i>Proteobacteria</i>	93	01	0,429
60	271	AF538929.1	<i>Variovorax</i> sp. WDL1 16S	<i>Proteobacteria</i>	98	01	0,429
61	272	AJ005991.1	Unidentified eubacterium 16S rRNA gene (clone TBS13)	<i>Proteobacteria</i>	86	01	0,429
62	273	AJ006090.1	Unidentified eubacterium 16S rRNA gene (clone TBS21)	NC7	97	01	0,429
63	275	AJ232793.1	Unidentified eubacterium 16S rDNA	<i>Acidobacteria</i>	96	01	0,429
64	90	AJ244353.1	Uncultured bacterium Riz 1077 16S	<i>Acidobacteria</i>	96	01	0,429
65	279	AJ252620.1	Agricultural soil bacterium clone SC-I- 17, 16S	NC7	93-97	08	3,433

Continuação Tabela 2							
66	281	AJ252646.1	Agricultural soil bacterium clone SC-I-64 16S	<i>Proteobacteria</i>	94	01	0,429
67	282	AJ252654.1	Agricultural soil bacterium clone SC-I-76, 16S	<i>Acidobacteria</i>	96-97	02	0,858
68	93	AJ252662.1	Agricultural soil bacterium clone SC-I-86, 16S	<i>Acidobacteria</i>	95	01	0,429
69	284	AJ252679.1	Rhizosphere soil bacterium clone RSC-II-27 16S	<i>Acidobacteria</i>	93	01	0,429
70	285	AJ252687.1	Rhizosphere soil bacterium clone RSC-II-57 16S	<i>Acidobacteria</i>	95	01	0,429
71	286	AJ252700.1	Rhizosphere soil bacterium clone RSC-II-86, 16S	<i>Acidobacteria</i>	86-95	02	0,858
72	287	AJ289993.1	Uncultured bacterium FukuN21 16S rRNA	<i>Bacteroidetes</i>	92	01	0,429
73	288	AJ292582.1	Uncultured eubacterium WD254 partial 16S rRNA gene, clone WD254	<i>Acidobacteria</i>	89-94	04	1,716
74	289	AJ292589.1	Uncultured eubacterium WD292 partial 16S rRNA gene, clone WD292	NC3	93-94	02	0,858
75	105	AJ296625.1	Uncultured bacterium GR-296.II.7 16S	NC2	93	01	0,429
76	293	AJ315066.1	<i>Bacillus</i> sp. 19498 16S rRNA gene	<i>Firmicutes</i>	93	01	0,429
77	294	AJ318168.1	Uncultured delta proteobacterium 16S Blrii41	<i>Proteobacteria</i>	89	01	0,429

Continuação Tabela 2							
78	109	AJ347048.1	Uncultured bacterium 16S rDNA clone TK67	NC7	90	02	0,858
79	296	AJ512945.1	<i>Caenibacterium thermophilum</i> 16S rDNA	<i>Proteobacteria</i>	92	01	0,429
80	297	AJ518762.1	Uncultured alpha proteobacterium partial 16S rRNA clone JG37-AG-3	<i>Proteobacteria</i>	93	01	0,429
81	298	AJ518767.1	Uncultured alpha proteobacterium partial 16S rRNA clone JG37-AG-25	<i>Proteobacteria</i>	94	01	0,429
82	299	AJ519375.1	Uncultured Holophaga sp. partial 16S rRNA clone JG37-AG-56	<i>Acidobacteria</i>	90	01	0,429
83	300	AJ532715.1	Uncultured delta proteobacterium partial 16S rRNA clone JG34-KF-369	<i>Proteobacteria</i>	90-97	05	2,145
84	301	AJ532720.1	Uncultured bacterium 16S rDNA clone JG34-KF-135	<i>Acidobacteria</i>	95	01	0,429
85	302	AJ542506.1	<i>Bacillus dretensis</i> strain LMG 21831	<i>Firmicutes</i>	98	01	0,429
86	303	AY037561.1	Uncultured soil bacterium clone S009 16S	<i>Proteobacteria</i>	93	01	0,429
87	304	AY037592.1	Uncultured soil bacterium clone S064 16S	<i>Acidobacteria</i>	95	01	0,429
88	305	AY037612.1	Uncultured soil bacterium clone S089 16S	<i>Acidobacteria</i>	94	01	0,429
89	307	AY037687.1	Uncultured earthworm cast bacterium C032 16S	<i>Acidobacteria</i>	88	01	0,429

Continuação Tabela 2							
90	309	AY037752.1	Uncultured earthworm cast bacterium clone C150 16S	<i>Acidobacteria</i>	86	01	0,429
91	310	AY095395.1	Uncultured yard-trimming-compost bacterium clone S-24 16S	<i>Acidobacteria</i>	94	01	0,429
92	132	AY100582.1	Uncultured bacterium clone cvf70138	<i>Proteobacteria</i>	94	01	0,429
93	312	AY102895.1	Uncultured bacterium clone BCM3P-26B 16S	NC2	92-93	02	0,858
94	314	AY150899.1	Uncultured Acidobacteriales bacterium GR13 16S	<i>Acidobacteria</i>	97	01	0,429
95	315	U20385.1	<i>Bacillus infernus</i> TH23 16S	<i>Firmicutes</i>	98	01	0,429
96	316	U62837.1	Unidentified eubacterium RB14 16S	<i>Verrucomicrobia</i>	94	01	0,429
97	317	U68606.1	Unidentified eubacterium from the Amazon 16S	<i>Acidobacteria</i>	95	01	0,429
98	144	U68644.1	Unidentified eubacterium from de Amazon 16S P8	<i>Acidobacteria</i>	96-97	02	0,858
99	149	X64381.1	BMC1716SD Bacterium (soil clone MC17)	NC9	98	01	0,429
100	321	X70403.1	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (LMG 9966) 16S rRNA	<i>Proteobacteria</i>	93	01	0,429
101	322	X81954.1	<i>Planctomyces</i> sp. 16S rDNA	<i>Planctomycetes</i>	95-97	02	0,858
102	323	X84451.1	Unknown organism, partial 16S rRNA gene (ID SBR1003)	<i>Acidobacteria</i>	90	01	0,429

Continuação Tabela 2							
103	324	Y12597.1	Uncultured bacterium DA008 16S	<i>Acidobacteria</i>	96	01	0,429
104	325	Y14304.1	<i>Hyphomicrobium aestuarii</i> 16S rDNA	<i>Proteobacteria</i>	94-97	05	2,145
105	326	Y14644.1	<i>Nitrospira</i> sp. GC86 16S rDNA	<i>Nitrospira</i>	97	01	0,429
106	328	Z78207.1	<i>M.phosphovor</i> us 16S rRNA gene	<i>Actinobacteria</i>	97-98	02	0,858
107	160	Z95707.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone 11-14)	<i>Acidobacteria</i>	92-96	05	2,145
108	330	Z95708.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone 11-24)	<i>Acidobacteria</i>	91-92	02	0,858
109	331	Z95709.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone 11-25)	<i>Acidobacteria</i>	93-95	01	0,429
110	161	Z95710.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone 32-10)	<i>Acidobacteria</i>	95	07	3,004
111	333	Z95712.1	Bacterial species 16S (clone 32-19)	<i>Acidobacteria</i>	96	10	4,291
112	334	Z95713.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone 32-20)	<i>Acidobacteria</i>	95	01	0,429
113	162	Z95714.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone 32-21)	<i>Acidobacteria</i>	94-97	02	0,858
114	336	Z95716.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone RB126)	<i>Acidobacteria</i>	93-94	02	0,858
115	337	Z95717.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone RB24)	<i>Acidobacteria</i>	92-95	02	0,858

Continuação Tabela 2							
116	338	Z95719.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone RB27)	<i>Acidobacteria</i>	94-98	02	0,858
117	163	Z95720.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone RB30)	<i>Acidobacteria</i>	93	01	0,429
118	340	Z95725.1	Bacterial species (clone ii3-15)	<i>Acidobacteria</i>	96	01	0,429
119	341	Z95726.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone ii3-36)	<i>Acidobacteria</i>	94-96	04	1,716
120	164	Z95727.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone ii3-7)	<i>Acidobacteria</i>	95-97	02	0,858
121	165	Z95728.1	Bacterial species 16S (clone iii1-15)	<i>Acidobacteria</i>	92-97	02	0,858
122	166	Z95730.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone iii3-16)	<i>Acidobacteria</i>	91-97	04	1,716
123	168	Z95732.1	Bacterial species 16S rDNA (clone KB2426)	<i>Acidobacteria</i>	92-95	02	0,858