

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**“DIVERSIDADE BACTERIANA DE UM LATOSSOLO SOB
CULTIVO INTENSIVO E FLORESTA ATRAVÉS DA ANÁLISE
METAGENÔMICA”**

Rodrigo Matheus Pereira
Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Profa. Dra. Eliana G.de Macedo Lemos

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2003**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**“DIVERSIDADE BACTERIANA DE UM LATOSSOLO SOB
CULTIVO INTENSIVO E FLORESTA ATRAVÉS DA ANÁLISE
METAGENÔMICA”**

Rodrigo Matheus Pereira

Orientadora: Profa. Dra. Eliana G. Macedo Lemos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia Agropecuária – Área de Concentração em Microbiologia .

**Jaboticabal – SP
Setembro – 2003**

P436d Pereira, Rodrigo Matheus
Diversidade bacteriana de um latossolo sob cultivo intensivo e
floresta através da análise metagenômica / Rodrigo Matheus Pereira.
-- Jaboticabal, 2003
x, 75 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2003
Orientador: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Banca examinadora: Ely Nahas, Maria José Valarini
Bibliografia

1. 16S rDNA. 2. Metagenoma. 3. Ecologia Microbiana. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.85:575

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

RODRIGO MATHEUS PEREIRA – Nascido em 24 de janeiro de 1975, no município de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. Ingressou no curso de Agronomia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Jaboticabal, em janeiro de 1995. No mesmo campus, em agosto de 1996, fundou, em conjunto com colaboradores, a Consultoria Agropecuária Júnior (CAP_{JR}), empresa júnior da qual participou por 4 anos, ocupando diferentes cargos executivos. Em janeiro de 2001 obteve o título de Engenheiro Agrônomo. Iniciou o curso de mestrado em Microbiologia em agosto de 2001. Participou do curso de Especialização *Latu Sensu* em Bioinformática, ministrado pelo Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), Petrópolis-RJ, no período de agosto a novembro de 2002.

"O único homem que está isento de erros é aquele que não arrisca acertar."

Albert Einstein

Aos meus pais,

Norival Carlos Pereira e Vera Lúcia Aparecida Borges Pereira,

que ensinaram a importância do estudo,

por darem amor, apoio e compreensão,

pelo esforço e trabalho que me possibilitaram o estudo,

pela educação, lições de vida e moral.

Às minhas irmãs,

Ana Carolina Pereira e Juliana Letícia Pereira,

pelo amor, amizade e apoio.

À minha namorada,

Andréa Perlatti

pelo amor, amizade e apoio.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, Criador do universo, acima de todas as coisas.

À minha família, pelo amor, apoio e confiança em todos os momentos.

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

À Profa. Dra. Lúcia M. Carareto Alves, por toda ajuda e amizade ao longo desses anos.

À minha namorada Andréa Perlatti, pelo auxílio nos momentos difíceis, pelo amor, carinho e compreensão.

Ao amigo Érico Leandro da Silveira, pela amizade e por toda colaboração neste trabalho.

À Dra. Luciane Prioli Ciapina, pela colaboração neste trabalho.

Ao amigo bioinformata Maurício Egídio Cantão, pela amizade, pela colaboração no banco de dados metagenômico e pela troca de conhecimentos em bioinformática.

A Maria Cândida Bento, pela ajuda na bancada e pela amizade durante esses anos de convívio no laboratório.

Aos amigos da equipe metagenômica Silvana Pompéia do Val de Moraes, Denílson César Scaquitto e Eliamar A. N. Pedrinho, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos da sala de bioinformática Tiago José Lopes e Emmanuel B. Contessotto, pela amizade e pelo bom humor.

Aos companheiros de república Rogério Carvalho do Nascimento e Luis Guilherme Bergamin, pela amizade e pela convivência.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. DIVERSIDADE DE PROCARIOTOS DO SOLO.....	3
2.2 IMPACTO DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS NA DIVERSIDADE DE PROCARIOTOS	6
2.3 ANÁLISE MOLECULAR E ABORDAGEM METAGENÔMICA DA DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 EXTRAÇÃO DO DNA DO SOLO	19
3.2 QUANTIFICAÇÃO DO DNA	20
3.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA POR DIGESTÃO ENZIMÁTICA.....	21
3.4 SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS NO DNA TOTAL DO SOLO.....	22
3.4.1 Amplificação do gene da subunidade ribossomal 16S do DNA de bactérias (16S rDNA)	22
3.4.2 Purificação do produto da amplificação do gene 16S rDNA ribossomal e quantificação.....	23
3.5. CLONAGEM EM PGEM-T	25
3.5.1 Reação de ligação	25
3.5.2 Transformação das células competentes	26
3.5.3 Cultivo dos clones.....	27
3.5.4 Seleção e estoque dos clones.....	28
3.5.5 Crescimento dos clones	29
3.6. SEQUENCIAMENTO	29
3.6.1 Extração do DNA plasmidial	29
3.6.2 Quantificação do DNA plasmidial.....	30
3.6.3 PCR de sequenciamento.....	31
3.6.4 Precipitação e lavagem das reações de sequenciamento.....	31
3.6.5 Preparo da amostra e sequenciamento do fragmento	32
3.7 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	32
3.7.1 Identificação dos clones	33
3.7.2 Análise da diversidade.....	33
3.7.3 Preparação da árvore filogenética	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.CONCLUSÕES	51

6.BIBLIOGRAFIA	52
APÊNDICE.....	61

DIVERSIDADE BACTERIANA DE UM LATOSSOLO SOB CULTIVO INTENSIVO E FLORESTA ATRAVÉS DA ANÁLISE METAGENOMICA

RESUMO - Os métodos tradicionais de isolamento e cultivo para análise da diversidade microbiana do meio ambiente são limitados, pois poucos microrganismos são cultiváveis. Grandes avanços na ecologia microbiana molecular ocorreram através da construção de bibliotecas metagenômicas, fornecendo análises dos microrganismos não-cultiváveis. O solo, que é o mais importante *habitat* para os microrganismos, principalmente procariotos, sofre contínuas alterações. Devido à prática agrícola intensiva, parte da diversidade de microrganismos do solo pode ser alterada, antes de se tornar conhecida. Este trabalho teve por objetivo estimar a diversidade das comunidades bacterianas pela extração direta de DNA do solo em duas áreas (área de agricultura intensiva e área de floresta nativa) no município de Guaíra-SP, ilustrando o impacto da agricultura na microbiota. Utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos e seqüenciamento parcial do gene 16S rDNA, fragmentos dos produtos de PCR (~1.5kb) foram clonados em vetor pGEM^R-T e transformados em *Escherichia coli*, linhagem DH5 α . Para cada biblioteca foram coletados e seqüenciados 240 clones. As seqüências obtidas foram submetidas à análise de similaridade com seqüências depositadas no banco de dados *GenBank*. As análises revelaram extensiva diversidade em ambos os solos, assim como características distintas das comunidades bacterianas, sendo que a área sob floresta apresentou maior diversidade em relação à área sob agricultura intensiva. Os resultados obtidos demonstram que as práticas agrícolas promoveram aumento quantitativo das comunidades bacterianas pertencentes aos filos *Proteobacteria* e *Firmicutes*, ao passo que causaram uma diminuição nas comunidades pertencentes aos filos *Acidobacteria* e *Verrucomicrobia*, corroborando estudos anteriores.

Palavras-chave: 16S rDNA, metagenoma, ecologia microbiana, bactéria, microbiota.

BACTERIAL DIVERSITY OF ONE HIGH CULTIVATED AND A FORESTY LATOSOL (OXISOL) SOILS THROUGH METAGENOMIC ANALYSIS

ABSTRACT- Traditional methods of isolation and cultivation to analyze the microbial diversity of environment are very limited, because few microorganisms are cultivable. Advances in molecular microbial ecology has occurred through the construction of metagenomic libraries, providing analysis of uncultured microorganisms. The soil, which is the most important *habitat* to microorganisms, principally prokaryotes, suffers continuous alteration. Due to intensive agricultural practices, part of the diversity of the soil microbial diversity could be reduced, even before being known. The aim of this work was to assess the diversity of bacterial community, through direct extraction of DNA of microorganisms from two conditions soil, (intensive agriculture and native forest) Guaíra-SP, to show the impact of agriculture in bacterial community. Using specific primers and partial sequencing of 16S rDNA gene, fragments from PCR (~1.5kb) were cloned in a vector pGEM^R-T and transformed into *Escherichia coli*, strain DH5 α . To each library 240 clones were collected and sequenced. The sequences obtained were compared against the GenBank database. The analysis showed extensive diversity in both soils, as well as distinct characteristics of bacterial community. Also, the forest field showed greater diversity than the intensive agriculture. The results obtained showed that agricultural practices promote quantitative grow of bacterial community that inhere the phyla *Proteobacteria* and *Firmicutes*, as well as generate one diminution in communities inhere the phyla *Acidobacteria* and *Verrucomicrobia*, as previously reported.

Key words: 16S rDNA, metagenome, microbial ecology, bacterium, soil, microbial diversity.

1.INTRODUÇÃO

A biosfera é dominada por microrganismos e sua identificação em amostras ambientais, tem sido alvo de intensas pesquisas no mundo. O crescente interesse nessa área deve-se ao fato de que muitas bactérias presentes em amostras ambientais não podem ser cultivadas devido às limitações na metodologia.

O uso de técnicas moleculares em ecologia microbiana tem possibilitado a descoberta de novos microrganismos até então desconhecidos. Através da técnica de PCR, a amplificação de um gene comum a todas as bactérias permite a identificação de bactérias presentes em amostras de solo. O gene usado é o 16S rDNA. Este gene, que apresenta características conservativas ao longo da evolução, é uma subunidade ribossômica existente em todas as bactérias, responsável pela síntese de proteínas. O gene 16S rDNA está presente no conjunto de DNA bruto extraído de amostras ambientais do solo. A análise filogenética desse gene é um dos métodos mais comumente usados em estimativas de diversidade de bactérias do solo.

A técnica que investiga o conjunto dos genomas encontrado na microbiota total do solo é denominada metagenoma. Essa técnica propicia muito mais informações a respeito da diversidade de microrganismos no solo do que os tradicionais meios de cultivo, principalmente pelo fato de que nem todos os microrganismos presentes no ambiente podem ser cultivados com os meios de culturas disponíveis.

A diversidade de microrganismos no solo é muito maior do que se imaginava. No entanto, devido às grandes alterações realizadas pelas práticas agrícolas no solo, boa parte dessa diversidade pode ser reduzida antes mesmo de tornar-se conhecida. O grande aumento de produtividade agrícola das últimas décadas trouxe como consequência a degradação do solo, o que tem reduzido a capacidade de produção dos solos em torno de 40% do solo agricultável mundial (OLDEMAN, 1994). Grande parte das alterações físico-químicas e biológicas realizadas no solo ocorrem devido à agricultura. Estes solos sofrem degradação física, como erosão e compactação, degradação química devido à acidificação, perda de nutrientes e uso intensivo de defensivos e fertilizantes, além da perda de matéria orgânica e da biodiversidade. Toda

essa mudança ambiental pode alterar a população microbiana, causando desequilíbrios no meio ambiente, e provocando danos na ciclagem dos nutrientes.

Com o objetivo de avaliar o impacto dessas atividades na diversidade bacteriana, este trabalho avaliou dois solos: um caracterizado pelo (irrigação por pivô central, uso intenso de defensivos, técnicas tradicionais de preparo do solo) principalmente para a produção de tomate e feijão e outro sob floresta, não modificado pelo homem, ambos do município de Guaíra, no estado de São Paulo, Brasil. O método de acesso ao conteúdo metagenômico dos referidos solos foi de análise do 16S rDNA através da extração direta do DNA total.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Diversidade de procariotos do solo

O solo constitui, indubitavelmente, um dos principais reservatórios de carbono orgânico da Terra e um dos mais importantes habitats para microrganismos, principalmente procariotos. A abundância do carbono procariótico e outros elementos sugerem que cerca de metade do protoplasma vivo da Terra seja de origem microbiana (WHITMAN et. al, 1998).

Devido à vasta diversidade, às grandes populações e à longa história evolutiva, os microrganismos vêm contribuindo fortemente com a riqueza e complexidade das interações entre os organismos do solo, incluindo desde simbioses altamente específicas a mutualismos difusos (BEARE et al., 1995). Tais organismos são componentes essenciais no processo de decomposição do solo, no qual resíduos de plantas e animais são degradados em matéria orgânica, liberando nutrientes na cadeia alimentar.

Até recentemente, com o desenvolvimento de técnicas de cultivo puro, os microrganismos puderam ser estudados individualmente e caracterizados, em algum grau, principalmente por critérios nutricionais e bioquímicos. Entretanto, a abordagem de cultivo limitou seriamente a avaliação taxonômica e filogenética, como estimativa da diversidade microbiana, devido à falha de cultivo da maioria dos microrganismos pelos métodos convencionais (PACE, 1997). Nesse contexto, numerosos meios de cultura, seletivos e não-seletivos, foram utilizados para enumerar e isolar microrganismos do solo e da rizosfera com influência dos mesmos nos graus de diversidade genética obtidos (SORHEIM et al., 1989; BUYER, 1995; TABACCHIONI et al., 2000).

Por outro lado, métodos de cultivo microbiano inibem o exame de interações ecológicas entre os microrganismos, dificultando ou impedindo a compreensão de processos dinâmicos que ocorrem no meio ambiente (ATLAS, 1997). Entretanto, ferramentas moleculares e tecnologias baseadas em seqüências gênicas vêm

reduzindo essas limitações e revelando nova perspectiva sobre a diversidade microbiana.

A caracterização dos microrganismos *não-cultiváveis*, utilizando-se de métodos moleculares e análises filogenéticas a partir de seqüências de DNA, é, portanto, um esforço para identificar e conhecer suas distribuições e funções no meio ambiente. Esses novos métodos de detecção de microrganismos, sem necessariamente cultivá-los, certamente contribuirão para inferências sobre a significância dos mesmos nos solos.

Ambas as abordagens, baseadas em cultivo (HATTORI et al., 1997) ou cultivo-independente, apóiam, uma vez mais, o estabelecido de que os solos representam um dos mais diversos habitats para microrganismos. Estudos moleculares confirmam essa rica diversidade, com pouca ou nenhuma representação entre organismos previamente estudados. Essa afirmação pode ser verificada em diversos trabalhos, como o obtido com análises de seqüências de 16S rRNA entre divisões bacterianas divergentes (HUGENHOLTZ et al., 1998), por exemplo. Assim, as classes α , β , γ e δ do filo *Proteobacteria* são usualmente bem representadas, como o são *Cytophagales*, *Actinobacteria* e gram-positivas de baixo conteúdo de GC. Estes resultados são particularmente relevantes para a descoberta de produtos naturais, pois membros cultiváveis dessas últimas duas divisões são grandes produtores de antibióticos (RHEIMS et al., 1996).

A análise da diversidade de uma comunidade bacteriana em quatro diferentes solos cultivados com pinheiros, usando a região 16S rDNA e a técnica RFLP (restrict fragment length polymorphism), revelou que embora a comunidade bacteriana fosse muito rica, já que representantes de filos como *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* e bactérias gram-positivas estavam presentes, grandes variações ocorriam em sua composição entre as diferentes amostras (DUNBAR et. al. 1999).

O número dos microrganismos e suas biomassas coletivas variam dentro e entre os diferentes tipos e condições dos solos, sendo o grupo das bactérias muito numeroso. Estimativas realizadas em diferentes solos relatam variações de número de células procarióticas por grama de solo entre 4×10^6 até 2×10^9 (WHITMAN et al., 1998).

A comparação entre diferentes estimativas é possível. Estimativas não-paramétricas são, particularmente, promissoras para dados sobre a microbiota, sendo que para alguns habitats, amostras que variam de 200 a 1000 clones podem detectar a diferença de riqueza entre espécies. O seqüenciamento desse número de clones só é possível através do desenvolvimento da tecnologia de seqüenciamento automático de alto rendimento. A união desta tecnologia com as estimativas oferecidas pela estatística oferecem um poderoso meio para estudar a ecologia e evolução da diversidade microbiana no meio ambiente (HUGUES et. al, 2001).

Para estimar o número de *taxa* da comunidade de procariotos existente no meio ambiente, foi construída uma curva de abundância de espécies log-normal, baseada em dois parâmetros mensuráveis: o número total de indivíduos na comunidade e os membros mais abundantes nela. Partindo-se dessa premissa, uma estimativa de $6,4 \times 10^4$ a $3,8 \times 10^4$ indivíduos por grama de solo foi obtida. Especulando-se a diversidade bacteriana em grande escala, uma tonelada de solo poderia conter 4×10^6 diferentes táxons. No entanto, variações na diversidade local e global das comunidades procarióticas podem ocorrer, visto que esta avaliação foi apenas teórica. Essa estimativa também pode sofrer alterações à medida que o conhecimento relativo à comunidade procariótica crescer (CURTIS et. al, 2002).

Na avaliação dessa diversidade de microrganismos no solo, índices de diversidade ecológica, como o índice Shannon-Weaver, o índice de similaridade de Sorenson's ou o índice de similaridade de Bray-Curtis, assim como medidas de riqueza ou eventualidade, estão sendo cada vez mais usados em ecologia microbiana (KENT e TRIPLETT, 2002).

Contudo, as estimativas variam muito, dependendo dos índices usados. Embora todos os índices concordem em um aspecto: a diversidade de procariotos no solo é gigantesca. Entretanto, a maioria dos estudos confirma a hipótese de que a extensa maioria da diversidade de microrganismos do solo ainda está por ser conhecida (WARD, 2003).

Os procariotos se dividem em duas partes na árvore da vida formando os domínios *Archaea* e *Bactéria*. O domínio *Archaea* compreende 25 filos enquanto o domínio *Bactéria* compreende 23 filos. (GARRITY, 2002).

Os organismos pertencentes ao domínio *Bactéria* constituem um grupo de microrganismos de ocorrência cosmopolita nos mais diversos habitats. Estes apresentam uma enorme diversidade de vias metabólicas, reunindo organismos especializados na utilização de compostos orgânicos (heterotróficos e organotróficos) ou inorgânicos como fonte de energia (quimiorganotróficos e litotróficos) e aqueles capazes de utilizar luz como fonte de energia no metabolismo (fototróficos) (CANHOS e VAZOLLER, 1997).

Segundo LEWINSOHN et al. (2002), estima-se que no Brasil exista um número entre 300 a 450 de diferentes espécies de bactérias do solo descritas e conhecidas, enquanto no restante do mundo esse número passa para 4200. Também relata que na análise dos dados do levantamento, a diversidade de microrganismos no Brasil ainda é pouco estudada.

2.2 Impacto das condições ambientais na diversidade de procariotos

A diversidade biológica de muitos ecossistemas pode ser ameaçada por processos degradativos diversos. Relativamente pouco tem sido feito para quantificar as relações benéficas entre diversidade microbiana, funcionamento do solo, qualidade vegetal e sustentabilidade do ecossistema (KENNEDY & SMITH, 1995). Para se obter uma melhor visão dos processos microbianos no ecossistema, é essencial estudar sua diversidade funcional em combinação com sua diversidade taxonômica. Em agroecossistemas, as funções mais importantes são aquelas envolvidas na ciclagem de nitrogênio e carbono, manutenção da estrutura do solo, antibiose, etc. Relata-se que a desertificação do ecossistema terrestre atinge milhões de hectares anualmente como resultado dos impactos das atividades agrícolas degradativas antropogênicas, caracterizadas pelo exacerbamento da atividade dos agentes naturais, ameaçando a sustentabilidade dos solos. Distúrbios nas comunidades naturais vegetais são os

primeiros sintomas visíveis, porém freqüentemente acompanhados ou precedidos por perda das propriedades físico-químicas e biológicas, principalmente, microbiológicas dos solos (MÄDER et al., 1996; REQUENA et al., 2001). Tais propriedades determinam, decisivamente, a fertilidade e a qualidade dos solos, impactando diretamente sobre o estabelecimento e a produtividade das plantas. Sabendo-se que apenas uns poucos organismos do solo são produtores primários, sendo em sua maioria saprófitas ou entidades mutualísticas, que dependem da produção primária das plantas, concluiu-se que esses dois compartimentos estão fundamentalmente interligados (OHTONEN et al., 1997). O funcionamento do ecossistema do solo é, portanto, governado, em grande parte, pela dinâmica de sua população microbiana, a qual é fortemente influenciada pelos distúrbios a que o solo é submetido.

Sistemas convencionais de produção baseados em defensivos agrícolas constituem fontes de poluição que, direta ou indiretamente, contribuem para a degradação do ambiente biológico do solo, com destruição dos recursos naturais (FILSER et. al., 1995). Em comunidades microbianas submetidas a três diferentes herbicidas à base de fenil uréia, em análise realizada por um período de onze anos, observou-se que o número de bactérias cultiváveis heterotróficas diminuiu significativamente. Além disso, a análise do perfil obtido pela técnica de BIOLOG GN revelou que comunidades tratadas com herbicidas diferem significativamente quando comparadas ao controle. Outra alteração foi o aparente declínio de *Acidobacterium* nos solos tratados com os três herbicidas. Entretanto, maiores estudos são necessários para saber se o declínio foi causado diretamente pelo herbicida ou pela alteração da comunidade macroflora causada pelo herbicida (FANTROUSSI et al., 1995). Comunidades de bactérias do solo em uma plantação de pinus também apresentaram declínio sob efeito da aplicação do herbicida glifosato quando comparadas a um solo padrão. (BUSSE et. al., 2001).

Outro defensivo largamente utilizado na agricultura são os fumegantes. Solos utilizados para agricultura são largamente tratados com fumegantes para fornecer um controle eficiente de nematóides, fungos fitopatogenicos do solo e plantas daninhas

para culturas de alto valor, porém seus efeitos sobre a comunidade microbiana como um todo são pouco conhecidos.

IBEKEWE et. al (2001) utilizaram técnicas cultivo-dependente (Biolog) e cultivo-independente, como eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (DGGE) e ácidos graxos de fosfolipídios (PLFA), em DNA ribossomal amplificado diretamente do solo, para avaliar a habilidade de a comunidade microbiana se recuperar após o tratamento com fumegantes. Foram observadas mudanças na estrutura da comunidade após a aplicação de quatro diferentes fumegantes, brometo de metila (MeBr), isotiocinato de metila, 1,3 dicloropropeno (1,3D) e cloropicrina. Os resultados obtidos pelo Biolog no perfil da comunidade microbiana heterotrófica indicaram variações severas na primeira semana. Após esse período os efeitos do brometo de metila e outros fumegantes foram expressos em níveis bem menores. Os resultados da análise de PLFA demonstraram que a comunidade de microrganismos mudou em todos os tratamentos para uma comunidade dominada por bactérias gram-positivas. Diferentes perfis foram observados entre os solos fumegados através do padrão de bandas do DGGE. O índice de diversidade de Shanon-Weaver foi calculado para os solos tratados com fumegantes, revelando que um alto índice de diversidade foi mantido entre o solo controle e os solos tratados com fumegantes, exceto o solo que foi tratado com brometo de metila. Solos tratados com esse fumegante foram, após algum tempo, dominados pelos microrganismos *Bacillus* spp. e *Heliobacterium oregonensis*. Outra conclusão foi que o maior impacto na comunidade microbiana foi gerado pelo brometo de metila e que o 1,3 D teve um impacto menor.

Da mesma forma, cultivo intensivo baseado em práticas culturais agressivas também alteram a biota do solo, causando, inclusive, erosão excessiva com poluição das águas superficiais e lençóis freáticos (HASSINK et al., 1991; FILSER et al., 1995; VALARINI et al., 1998).

O solo é um complexo sistema que compreende uma variedade de microhabitats com diferentes gradientes físico-químicos e condições ambientais descontínuas. Microrganismos vivem juntos em consórcios nos microhabitats interagindo entre si e com outras partes da biota do solo (TORVISK e OVREAS, 2002).

Através da análise da distribuição espacial das bactérias nos diferentes níveis de microhabitats, verificou-se que em solos submetidos a diferentes tratamentos com fertilizantes, mais de 80% das bactérias foram localizadas nos microporos dos microagregados estáveis no solo (RANJARD et al., 2000). Os microhabitats oferecem as condições mais favoráveis para crescimento, com relação à disponibilidade de água e disponibilidade de substrato, difusão de gás e proteção contra predadores. O tamanho da partícula tem um alto impacto na diversidade microbiana e na estrutura de sua respectiva comunidade, assim como o pH e a quantidade de matéria orgânica disponível (SESSTISCH et. al., 2001). Ainda através da análise de distribuição espacial verificou-se que a diversidade microbiana em frações de pequenas partículas no solo era maior do que em frações de grandes partículas de solo. Além disso constatou-se que a maior parte da comunidade microbiana do solo pode ser definida como partícula-específica. Uma alta diversidade de bactérias pertencentes ao filo *Acidobacteria* e ao gênero *Prostheco bacter* do filo *Verrucomicrobia* estavam presentes em pequenas partículas (silte e argila). Enquanto grandes partículas (areia) abrigavam poucas bactérias do filo *Acidobacteria*, sendo dominadas por bactérias pertencentes ao classe *Alfaproteobacteria* do filo *Proteobacteria*. Outras investigações indicam que o tipo e a quantidade de matéria orgânica no solo influenciam fortemente a abundância microbiana e a diversidade funcional nos ecossistemas do solo (DE FEDE et. al, 2001; GRAYSTON et. Al. 2001).

SMITH et al. (2001) investigou a relação entre a abundância de microrganismos e o estado nutricional do solo através de seqüências de 16S rDNA distribuídas entre 5 filios de bactérias. Seus resultados sugeriram que solos com alto conteúdo de nutrientes disponíveis exibiam seleção positiva para as classes *alfaproteobacteria* e *gammaproteobacteria*, isto é, indicativo para a “Seleção r”, a qual é uma seleção para bactérias com altas taxas de crescimento. Já com um baixo conteúdo de nutrientes no solo, a percentagem de bactérias pertencentes ao filo *Acidobacteria* aumenta, sendo esta atividade indicativa de “Seleção k”, a qual é seleção para bactérias com baixo potencial de crescimento mas alta capacidade para competir por substratos. A taxa entre o número de bactérias pertencentes aos filios *Acidobacteria* e *Proteobacteria* foi

indicativa do status nutricional do solo. Essa relação foi baixa em solos oligotróficos, média em solos agrícolas com baixo teor de matéria orgânica e alta em solos com elevado teor de matéria orgânica.

O desmatamento (BORNEMAN e TRIPLETT, 1997) e a desertificação, em particular, também apresentam impacto negativo, reduzindo o potencial de inóculo de simbiontes microbianos mutualísticos, os quais constituem fatores essenciais na ciclagem dos principais nutrientes de plantas e, portanto, na sustentabilidade da cobertura vegetal em habitats naturais (REQUENA et. al., 2001).

Corroborando essas observações verificou-se que no solo de uma área que sofreu o efeito do desmatamento, o conteúdo GC do DNA extraído do solo de pastagem foi significativamente maior do que o do DNA do solo sob floresta. Bactérias pertencentes ao filo *Fibrobacteres* foram dominantes no solo sob floresta enquanto as bactérias pertencentes às classes *Betaproteobacteria* e *Alfaproteobacteria* do filo *Proteobacteria* dominavam solos de pastagem (NUSSLEIN e TIEDJE, 1999). Através da análise do espaço ribossomal intergênico (RISA) observou-se um profundo impacto na diversidade da comunidade bacteriana em uma área da Amazônia que foi desmatada e substituída por pastagem (BONERMAN, 1997).

O crescimento e desenvolvimento das culturas estão estritamente relacionados à natureza da microflora do solo. Baixa eficiência de produção agrícola é influenciada por fatores fisiológicos culturais, pelo ambiente e outros fatores biológicos representados, principalmente, pelos microrganismos do solo. A microbiota do solo e, particularmente, da rizosfera podem acelerar o crescimento das plantas, podendo apresentar efeito primário na qualidade do solo e do cultivo. Manejo de associações simbióticas entre plantas-microrganismo, por exemplo, pode restaurar ecossistemas desertificados (REQUENA et. al., 2001).

A degradação do solo agricultável resulta na perda de biodiversidade, mas práticas de gerenciamento do solo podem ser usadas para tentar diminuir essa degradação. GIRVAN (2003), analisando três solos de fazendas na Inglaterra sob diferentes métodos de uso, observou que pequenas variações ocorriam no perfil da comunidade microbiana. Entretanto, o fator chave na determinação da composição da

comunidade bacteriana foi o tipo de solo. Também verificou que culturas de plantas leguminosas em alguns tipos de solo afetavam positivamente o teor de matéria orgânica, o que gerava alterações na comunidade bacteriana.

Dados semelhantes foram observados por BUCKELY e SCHMIDT (2001), que através das mesmas técnicas, 16S rDNA e T-RFLP, usadas por GIRVAN, verificaram que a diversidade microbiana de solos sob campos cultivados diferiu pouco quando apenas práticas agrícolas eram alteradas. Contudo, ao comparar a diversidade entre os solos cultivados e não cultivados, verificaram que a diferença foi significativa.

2.3 Análise molecular e abordagem metagenômica da diversidade microbiana do solo

Diferentes filos de bactérias comumente dominam o solo, mas o significado ecológico de boa parte de suas relações permanece desconhecido. Principalmente devido ao desconhecimento das relações entre o tratamento do solo e seus efeitos na ecologia microbiana.

A partir da década de 80, um grande número de metodologias baseadas no estudo do DNA vem sendo desenvolvidas para análise da diversidade microbiana dos solos (AMANN et. al., 1995; ZHOU et. al., 1996; BORNEMAN et. al., 1997; CULLEN et. al., 1998; DUARTE et. al., 1998; SANDAA et. al., 1998; TORSVIK et. al., 1998). Com quantidades pequenas de solo, tais procedimentos permitem análise de múltiplas amostras com eficiências próximas de 80% e purificação de DNA através de *kits*, tornando-as, também, muito rápidas (ZHOU et al., 1996; KUSKE et al., 1998; OGRAM, 2000). Através de reassociação cinética do DNA extraído de comunidades bacterianas, TORSVIK et al. (1990a, 1990b) encontraram valores acima de 10 mil espécies em apenas um grama de solo sob floresta, muitas das quais nunca haviam sido cultivadas em laboratório. RITZ e GRIFFITHS (1994), através de hibridização do DNA total extraído de diferentes solos, e sob diversas condições, verificaram diferentes padrões de diversidade genética entre os mesmos.

Análises da comunidade microbiana baseadas em PCR também são comumente usadas devido à facilidade de analisar muitas amostras e ainda restringir essa análise a organismos específicos através de oligonucleotídeos. Diferenças nos perfis de eletroforese entre amostras refletem diferenças na composição da comunidade e a abundância de indivíduos nas populações da comunidade. Embora o perfil eletroforético de uma amostra ambiental não reflita a composição taxonômica de uma comunidade microbiana, a informação filogenética sobre um membro da comunidade em particular pode ser obtida por isolamento e seqüenciamento de fragmentos de DNA de interesse (KENT e TRIPLET, 2002).

Os métodos DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) e TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) funcionam separando seqüências baseadas em suas propriedades desnaturantes, com diferenças de migração de gradientes químicos e físicos, respectivamente (MACGAIG et. al, 2001).

Em um estudo de estratificação e sazonalidade de uma comunidade diversa de bactérias em um solo sob floresta de pinus na Indonésia, foi utilizada com sucesso a técnica de DGGE, após ser extensivamente testada para minimizar erros (KRAVE et. al. 2002).

Usando a técnica de RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") em consórcio com a análise da biomassa microbiana do solo, YANG et al. (2000) relata que obteve um eficiente meio de estudar a diversidade da comunidade microbiana do solo, embora contaminantes do solo possam afetar resultados de populações raras e dominantes na diversidade de comunidades do solo, necessitando por esse motivo de mais estudos.

Outra técnica de análise de padrões em perfis eletroforéticos usada é a RISA ("Ribossomal Intergenic Space Analysis"). Esta técnica conta com o polimorfismo do comprimento do espaço intergênico entre as subunidades do rRNA para gerar fragmentos. Devido a sua facilidade de realização, baixo custo, relativa eficiência e ausência de equipamentos específicos, esta técnica tem sido amplamente usada (BORNEMAN et. al. 1997, ROBLETO et. al. 1998; RANJARD et. al., 2000;).

Também usando a região ribossomal, a técnica conhecida como ARDRA (“Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis”) gera diferentes perfis de bandas, possibilitando a análise de padrões para diferentes comunidades (MASSOL-DEYA, 1995).

Uma técnica mais robusta é a do T-RFLP (“Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism”) que gera somente um fragmento por espécie, geralmente um gene de interesse específico. Após o produto da amplificação ser digerido por enzimas de restrição, ele é marcado com fluorescência. As amostras são, normalmente, corridas em gel para seqüenciamento, o que fornece uma alta resolução além de uma elevada sensibilidade de detecção (MARSH et. al., 2000). Porém, esta técnica apresenta a desvantagem de ser necessário conhecer as seqüências para usar as enzimas de restrição adequadas (DAHLLOF, 2002).

De maneira geral, as tecnologias baseadas em PCR são rápidas e relativamente baratas. No entanto, quando aplicadas na análise de amostras ambientais apresentam problemas por diferentes motivos, por exemplo devido à extração de DNA do solo, diferenças celulares entre diferentes grupos taxonômicos, baixa densidade bacteriana em alguns ambientes e, principalmente, contaminação das amostras ambientais por ácidos húmicos que afetam diretamente essas metodologias (KENT e TRIPLET, 2002).

Quando uma informação filogenética mais específica é desejada, técnicas mais refinadas são empregadas. Entre elas, a mais usada, sem dúvida, é a de seqüenciamento das unidades ribossomais.

As subunidades ribossomais estão entre as macromoléculas evolutivamente mais conservadas em todos os sistemas vivos. Suas regras funcionais nos sistemas de processo de informação devem ter sido bem estabelecidas desde os primeiros ancestrais de bactérias – *Archaea* e eucariotos.

Os genes do rDNA exibem um ancestral comum em todos os seres vivos e aparentemente não há transferência lateral deles entre espécies. Devido a sua limitação funcional, grandes porções dos genes de rDNA são bem conservadas. Suas seqüências podem ser usadas para medir distâncias filogenéticas mesmo entre

organismos pouco relacionados. Em sua essência, mudanças de nucleotídeos nas seqüências podem servir como índices de mudança evolutiva.

Muitos trabalhos usam a região 16S rDNA para estudar a relação filogenética entre os domínios *Bacteria* e *Archaea*. Quando há alguma similaridade entre duas seqüências, isso pode indicar que elas estão filogeneticamente relacionadas. A grande vantagem de usar moléculas de rDNA é que elas estão presentes em todos os organismos vivos e isto permite compará-las para determinar sua distância evolutiva.

Foi Carl Woese quem iniciou os estudos com o gene 16S rDNA. Ele argumentou que esta molécula era um excelente marcador molecular pelos seguintes motivos: primeiro, por ocorrer em todos os organismos vivos; segundo, por ser longa (~1500bp) e apresentar regiões altamente conservadas usadas para procurar relações filogenéticas distantes; terceiro, por possuir pequenas regiões variáveis, permitindo diferenciar organismos muito próximos, por não apresentar tendência de alteração rápida e por apresentar função de grande importância na expressão do gene (ATLAS, 1997).

O acesso molecular individual às espécies de bactérias existentes na natureza tem sido baseado na determinação das seqüências 16S rDNA de genes amplificados e clonados de DNA derivado do solo (AMANN et. al., 2000; BORNEMAN et. al., 1996; LEE et al., 1996; KUSKE et. al., 1997; GELSOMINO et al., 1999).

A análise da comunidade total de DNA de uma amostra constitui uma medida de sua heterogeneidade, inferindo-se a diversidade microbiana presente na mesma. Coletivamente, os genomas da microbiota total encontrada na natureza são denominados metagenoma (HANDELSMAN et al., 1998), sendo que tal estratégia acessa muito mais informação genética que os procedimentos baseados em cultivo. Essa abordagem tem sua origem nos genomas de eucariotos (RONDON et al., 1999b) e envolve o uso de um vetor plasmidial estável, por exemplo, o pGEM-T (Promega) para clonagem de segmentos de DNA de 1,5 kb de amostras ambientais em *Escherichia coli* DH10B como hospedeiro (DUNBAR et. al., 1999). Esse vetor têm sido utilizado como sistema de clonagem para estudar genomas microbianos de organismos cultivados (RONDON et al., 1999) ou de DNA microbiano total extraído diretamente do

solo (RONDON et al. 2000). Bibliotecas do gene 16S rDNA constituem, portanto, uma ferramenta útil para o estudo do conteúdo genômico total da microbiota do solo. Através de clonagem e análise de segmentos de DNA microbiano do solo, pode-se avaliar com mais detalhes a fisiologia e a função dos microrganismos na natureza. No solo, combinando estudos de seqüências de 16S rDNA com análises metagenômicas, ter-se-iam os primeiros passos para ligação da fisiologia e função de sua microflora total (RONDON et al., 1999).

Além do vetor plasmídeo pGEM-T (Promega), um outro vetor tem sido usado em trabalhos recentes, o “bacterial artificial chromosome” (BAC). A vantagem dos vetores BAC é a de manterem grandes insertos de DNA (maiores que 100 kb) estáveis em *Escherichia coli*, facilitando a clonagem de grandes fragmentos de DNA. Além disso, o vetor BAC pode ser usado para expressar DNA diferente de promotores diferentes em *E. coli*, mesmo com baixo número de cópias do vetor BAC (um ou dois por célula). A expressão de DNA heterólogo de *Bacillus cereus* em *E. coli* através do sistema BAC com razoável freqüência de ocorrência valida essa idéia (RONDON et al., 2000).

Outros pesquisadores têm usado com sucesso a clonagem de grandes fragmentos de DNA para isolamento de antibióticos de bibliotecas metagenômicas, assim como para estudar a fisiologia de microrganismos não cultivados em comunidades do solo (GILLESPIE, 2002; LILES, 2003).

Entretanto, outras metodologias de análise da biodiversidade, além das baseadas em PCR, também podem ser usadas, como FISH, BIOLOG GN e “microarrays”.

A metodologia FISH (“Fluorescence in situ hybridization”) é um exame de microscopia direta que pode ser usado para avaliar a distribuição e a função dos microrganismos no solo. Este método usa hibridização de oligonucleotídeos e sondas complementares a regiões do gene 16S rDNA para determinação de abundância de procariotos “in situ”, (AMANN, 2001; KENT, 2002).

Para obter uma melhor percepção dos processos microbianos no ecossistema é essencial estudar a diversidade funcional em combinação com a diversidade taxonômica. A maioria dos métodos apresentados explora a análise de diversidade

taxonômica, através das metodologias de PCR, mas técnicas que exploram a diversidade funcional independente de PCR também são usadas em ecologia microbiana.

A diversidade de funções metabólicas que a comunidade microbiana do solo possui é freqüentemente examinada através de ensaios usando BIOLOG GN. Originalmente, as placas de BIOLOG GN foram desenvolvidas para classificarem isolados de bactéria baseado na capacidade desses isolados oxidar 95 diferentes fontes de carbono. Essa metodologia foi adaptada possibilitando caracterizar o potencial funcional da comunidade microbiana. Entretanto, experimentos com BIOLOG GN apresentam os mesmos problemas dos métodos baseados em meio de cultura, ou seja, o perfil metabólico resultante pode não ser uma representação acurada da diversidade funcional da comunidade microbiana (SMALLA, 1998).

Uma técnica que pode acessar tanto a função ecológica como a proximidade filogenética de populações microbianas é a técnica dos microarranjos de DNA ("microarray"). Essa tecnologia é uma ferramenta poderosa para análise de expressão de genes e sua regulação em escala genômica, além de poder detectar polimorfismos genéticos. Por esses motivos, torna-se um poderoso instrumento para a caracterização da comunidade microbiana e análise de sua função biológica.

Com o intuito de avaliar o potencial da tecnologia de "microarray" para a análise funcional da comunidade de microrganismos no meio ambiente, WU et. al (2001) preparou "arrays" de genes envolvidos com o ciclo do nitrogênio para detecção desses no meio ambiente. Contudo, observou que a capacidade do "microarray" para medir a abundância de genes-alvo em amostras do meio ambiente foi pouco clara devido à divergência entre as seqüências-alvo. Essa divergência afetou a intensidade do sinal de hibridização. Entretanto, apesar dos problemas encontrados, o experimento pôde verificar diferenças na distribuição dos genes nas amostras analisadas, concluindo-se que a técnica do "microarray" realmente é um instrumento poderoso para análise funcional de microrganismos no ambiente, embora necessite de maiores estudos.

A metagenômica oferece, assim, um caminho para acessar de forma mais completa a diversidade microbiana total de um solo, permitindo examinar a genômica

funcional dos membros de sua microflora, mesmo sem meios de cultivo de muitos dos organismos presentes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de amostras de solo foram realizadas no município de Guaíra e na fazenda Lagoa do Fogão, localizada no mesmo município. Guaíra está situada no norte do Estado de São Paulo e suas coordenadas geográficas são 20°20' S de latitude e 48°23' W de longitude, com uma altitude de 500 metros. A média da precipitação anual é de 1330 mm, com temperaturas médias, mínima e máxima, de 17°C e 30°C, respectivamente.

O solo da área cultivada do município foi classificado como “Latosolo Roxo” e as características químicas e físicas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características químicas e físicas dos solos sob cultivo e sob floresta.

Parâmetros	Cultivado	Floresta
pH	6,2	4,9
Matéria orgânica (g/dm ³)	41	48
K (nmol/dm ³)	4,5	1,2
Ca (nmol/dm ³)	67	33
Mg (nmol/dm ³)	50	19
Argila (g/kg)	390	510
Limo (g/kg)	290	250
Areia Fina (g/kg)	190	150
Areia Grossa (g/kg)	130	90
Classe textural	Argilosa	Argilosa

A área cultivada está em uso há mais de dez anos. O sistema utilizado é o plantio direto com cultivos sucessivos de tomate ou feijão no inverno, de maio a junho, seguido de milho, de agosto a setembro, e soja em dezembro. Essa agricultura é

caracterizada por ser bastante intensiva, utilizando-se de todos os recursos (adubos, pesticidas e irrigação) para produção o ano todo.

O solo sob floresta, coletado na fazenda Lagoa do Fogão, foi classificado como “Latossolo Variação Una” (LVUna), e suas características físicas e químicas também podem ser observadas na tabela 1.

O solo da fazenda Lagoa do Fogão é coberto por floresta original, por isso representa um solo não perturbado, ou seja, isento de interferências provocadas pelo homem.

A coleta do solo foi realizada de acordo com o seguinte procedimento: doze amostras simples foram coletadas ao acaso, em ziguezague, com profundidade de 0 - 20 cm, que depois de reunidas e homogeneizadas, resultaram em uma amostra composta.

3.1 Extração do DNA do solo

A extração do DNA presente nas amostras dos dois solos foi feita com a utilização do FastDNA[®] SPIN Kit (para solo) (BIO 101-QUANTUM BIOTECHNOLOGIES - Catálogo nº #6560-200), de acordo com as instruções do fabricante descritas a seguir.

Foram pesados 500 mg de cada solo em um tubo contendo “MULTIMIX 2 Tissue Matrix”, o qual contém uma mistura de partículas de sílica e cerâmica que propiciam uma lise eficiente de todos os microorganismos presentes no solo.

Neste tubo foi acrescentado 978 µL de tampão Fosfato Sódio e 122 µL de tampão MT. Esta mistura foi agitada vigorosamente colocando-se o tubo em um instrumento FastPrep durante 30 segundos, a 5500 rpm. Após esta agitação, o tubo foi centrifugado a 14.0000 x g por 30 segundos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado 250 µL de reagente PPS (Solução de Precipitação de Proteínas). A solução foi misturada agitando-se o tubo 10 vezes, manualmente. O tubo foi centrifugado por 5 min., a 14.000 x g, e o sobrenadante transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado 1 mL de suspensão de matriz de ligação. A solução foi misturada, manualmente, invertendo-se o tubo por 2 min. para permitir a ligação do

DNA à matriz e, posteriormente, foi deixado em repouso por 3 min. para permitir a decantação da matriz de sílica. Posteriormente, 500 mL do sobrenadante foram removidos cuidadosamente, para evitar que a matriz de ligação fosse ressuspensa e descartada. A matriz foi, então, ressuspensa no sobrenadante restante e 600 µL da mistura foram transferidos para o tubo SPIN, o qual foi centrifugado a 14.000 x g por 1 minuto. O conteúdo do tubo de coleta foi descartado e o restante do sobrenadante foi transferido para o filtro SPIN, o qual foi centrifugado novamente. Ao filtro SPIN foram adicionados 500 µL de solução SEWS-M (Lavagem Etanol Sal) e o tubo centrifugado a 14.000 x g, por 1 minuto. O volume no tubo de coleta foi descartado, o filtro recolocado no tubo de coleta e novamente centrifugado por 2 min. para retirar a solução de lavagem (SEWS-M) residual. O filtro foi acoplado a novo tubo e colocado para secagem durante 5 min. em “Speed-vac” a temperatura ambiente. Adicionaram-se, então, 50 µL de DES (Água livre de Dnase/Pirrogênio) ao filtro contendo a matriz, a qual foi ressuspensa, por forte agitação em “vortex”, para permitir uma eficiente eluição do DNA. O tubo foi centrifugado por 1 minuto, a 14.000 x g para transferir o DNA eluído para o tubo de coleta.

3.2 Quantificação do DNA

O DNA das amostras foi quantificado em gel de agarose 0,8%, em tampão TBE1X (Tris 89mM, Borato 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3), adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/mL). A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba modelo HORIZON 58 (GIBCO HORIZONTAL GEL ELECTROPHORESIS) e conduzida em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/mL), durante 1 hora e 30 min., a 100V constante.

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. Um DNA de concentração conhecida (50 ng/µL) foi aplicado em diferentes volumes para comparação visual da intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídio e

cálculo da concentração do material. O DNA das amostras foi visualizado sob luz UV e documentado em fotodocumentador modelo GEL DOC 1000 (BIO-RAD). O DNA também foi quantificado em espectrofotômetro Beckmann DU 640, sendo a leitura realizada nos comprimentos de onda de 260 nm (ácido nucléico) e 280 nm (proteína). A concentração de DNA nas amostras foi calculada considerando-se que a Intensidade óptica (DO) corresponde a 50 mg/μL de DNA dupla fita (SAMBROOK et. al., 1989). A relação 260/280 foi estimada para caracterizar a pureza do DNA, isto é, se o material estava pouco contaminado por proteínas ou compostos fenólicos.

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

3.3 Avaliação da qualidade do DNA por digestão enzimática

Devido à alta especificidade das enzimas de restrição aos seus respectivos sítios presentes no DNA, elas não conseguem cortar preparações de DNA de baixa qualidade. Assim, para verificar a qualidade do DNA total extraído foi realizado um ensaio de restrição enzimática utilizando-se uma enzima de restrição de corte freqüente, *Hha I*, cujo sítio de restrição é 5' - G CG↓C - 3'.

Para tanto, 0,5-1 μg de DNA total foi digerido com 10 U da enzima de restrição *Hha I* (10U/μL). Tampão React 2 1X (Gibco-BRL) (50 mM Tris-HCL (pH 8), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) e água ultrapura para completar o volume final de 20 μL. A digestão do DNA das amostras foi realizada a 37°C, "overnight".

Os produtos de restrição foram visualizados em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 1X, adicionado de brometo de etídeo (0,5 μg/mL). A corrida eletroforética foi realizada em uma HORIZON 58 (GIBCO HORIZONTAL GEL ELECTROPHORESIS) e conduzida em tampão TBE 1X (Tris 89mM, Borato 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3) adicionado de brometo de etídio (0,5 μg/mL), durante 3 horas e 30 min., a 100 V constante. Aos tubos foram adicionados 3 μL de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50 % de glicerol) e uma alíquota de 10 μL de volume total foi

aplicada no gel. O marcador de tamanho molecular utilizado foi o “ladder” de 1 kb (Invitrogen). Os produtos de restrição foram visualizados sob luz UV e o gel documentado em fotodocumentador modelo GEL DOC 1000 (BIO-RAD).

3.4 Seleção das bactérias no DNA total do solo

Para posterior avaliação da diversidade bacteriana do solo foi realizada a amplificação do DNA da subunidade ribossomal 16S do DNA. Esse gene é uma região conservada e freqüentemente utilizada para identificação de bacteriana em nível taxonômico de espécie (MACRAE, 2000).

3.4.1 Amplificação do gene da subunidade ribossomal 16S do DNA de bactérias (16S rDNA)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do gene da subunidade ribossomal 16S estão descritos abaixo (DUNBAR,1999):

PAF (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3')

PC5B (5'-TAC CTT GTT ACG ACT T-3').

As condições para a reação de PCR foram as seguintes: 100 ng de DNA molde, 200 μ M de cada dNTP, 2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1,5mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), tampão de PCR 1X (20 mM tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl (Invitrogen), 50 pmoles de cada oligonucleotídeo e água milli-Q esterilizada por filtração para completar o volume final de 50 μ L.

A amplificação das amostras foi realizada em um termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC-100, utilizando-se os seguintes ciclos: 1 ciclo de 94°C por 2 min., 30

ciclos (94°C por 30 segundos; 50°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto) seguidos de um ciclo final de 5 min. a 72°C. Ao final do programa as amostras no termociclador permaneceram a 4°C até serem retiradas.

Alíquotas de 5 µL dos produtos da amplificação adicionadas de 3 µL de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50 % de glicerol) foram separadas em gel de agarose 1,5%, adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/mL) para verificar a presença do fragmento. O marcador de tamanho molecular utilizado foi o “ladder” de 1 kb (Invitrogen).

A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba HORIZON 11-14 (GIBCO HORIZONTAL GEL ELECTROPHORESIS) e conduzida em tampão TBE 1X (Tris 89mM, Borato 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3), adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/mL), durante 1 hora, a 100 V constante. Os produtos da amplificação foram visualizados sob luz UV e o gel documentado em fotodocumentador modelo GEL DOC 1000 (BIO-RAD).

3.4.2 Purificação do produto da amplificação do gene 16S rDNA ribossomal e quantificação

A reação de amplificação do fragmento correspondente ao gene 16S foi realizada após 4 reações de PCR com volume final de 50 µL cada, totalizando 200 µL de reação para cada amostra de solo. Para a purificação do fragmento amplificado foram adicionados 20 µL de tampão de carregamento ao volume final de 200 µL para cada amostra de solo. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1%. Ao lado da canaleta contendo o padrão molecular de 1 kb (Invitrogen), uma alíquota de 8 µL de cada amostra foi aplicada. O volume restante das respectivas amostras foi aplicado ao lado das alíquotas correspondentes. A corrida eletroforética foi conduzida em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e

EDTA 2,5 mM, pH 8,3), sem a presença de brometo de etídio no gel e no tampão, durante 1,5 hora, a 100 V constante.

Após a eletroforese, as canaletas correspondentes ao padrão molecular e às alíquotas das respectivas amostras foram separadas do gel e coradas com brometo de etídio (0,5 µg/mL), durante 10 min.. Os fragmentos foram, então, visualizados em luz UV e a região dos fragmentos foi marcada. As canaletas foram, novamente, unidas ao gel e a região correspondente no gel foi cortada.

A região cortada do gel foi colocada em microtubos previamente pesados. A cada microtubo foram adicionados 30 µL para cada 1 mg de gel contido no microtubo de uma solução de NaCl 1 M. A mistura foi aquecida a 65°C durante aproximadamente 10 min., tempo suficiente para o gel solubilizar perfeitamente.

Um volume de fenol foi adicionado aos microtubos e, posteriormente, levado ao “vortex” por 2 min.. Os microtubos foram centrifugados a 20817 x g por 10 min.. Em seguida o sobrenadante foi coletado, tomando-se o cuidado de não coletar fenol, e transferido para novos microtubos.

Novamente, um volume de fenol foi adicionado aos microtubos e, posteriormente, levado ao “vortex” por 2 min.. Os microtubos foram centrifugados a 20817 x g por 10 min. em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi coletado, tomando-se o cuidado de não coletar o fenol, e transferido para novos microtubos.

Desta vez, um volume de clorofórmio foi adicionado aos microtubos, que foram levados ao “vortex” por 2 min.. Em seguida, foram centrifugados a 14000 x g por aproximadamente 10 min. em temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo adicionado 10% do volume de acetato de sódio 3 M, pH 6,8.

Em seguida, um volume de isopropanol foi adicionado aos microtubos que foram incubados “overnight” a 20 °C. Nova centrifugação foi realizada a 14000 x g por 30 min. a 4°C. Todo o volume dos microtubos foi descartado cautelosamente e os tubos foram invertidos em papel por 5 min., para retirada do excesso de isopropanol.

Cautelosamente, 1 mL de etanol 70% foi adicionado na parede do microtubo, que foi levado a centrifugação a 20817 x g por 15 min. a temperatura ambiente. Mais uma vez o conteúdo dos microtubos foi descartado e estes secos por 30 min. em temperatura ambiente.

Finalmente, o DNA eluído foi ressuspenso em 10 µL de TE (10:1) e deixado durante 2 horas em temperatura ambiente para solubilização.

Para a quantificação do DNA, uma alíquota de 3 µL do material amplificado purificado foi adicionada 147 µL de água estéril e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro Beckmann DU 640, sendo a leitura realizada nos comprimentos de onda de 260 nm (ácido nucléico) e 280 nm (proteína). A relação 260/280 foi estimada para caracterizar a pureza do DNA.

3.5. Clonagem em pGEM-T

3.5.1 Reação de ligação

Os produtos de PCR foram clonados no sistema de vetor pGEM^R-T (Promega - nº catálogo A3600) seguindo instruções do fabricante. Este sistema é conveniente para a clonagem de produtos de PCR. Este vetor é preparado cortando-se o vetor pGEM^R-5Zf(+) da Promega com a enzima EcoR V e adicionando-se timina ao terminal 3' de ambos os finais. Estes terminais 3' -T no sítio de inserção melhoram grandemente a eficiência de ligação de um produto de PCR aos plasmídeos, por evitar a recircularização do vetor e fornecer um terminal compatível para os produtos de PCR gerados por algumas polimerases termoestáveis, tais como a *TaqI* AmpliTaq^R, *Tfl*, *Tth* e outras (MEZEI E STORTS, 1994; ROBLES E DOERS, 1994). Estas polimerases, freqüentemente, adicionam uma desoxiadenosina aos terminais 3' dos fragmentos amplificados (CLARK, 1988; NEWTON E GRAHAM, 1994).

As reações de ligação foram realizadas como descrito abaixo:

- Tampão de ligação rápida T4 DNA ligase 1X (30 mM Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM de MgCl₂; 10 mM DTT; 1m,M ATP; 5% de polietilenoglicol (PM 8000, grau ACS));
- pGEM^R-T (50 ng);
- T4 DNA ligase (3 U);
- Produto de PCR (inserto);
- Água milli-Q esterilizada por filtração para completar o volume final para 10 µL.

O cálculo da quantidade do produto de PCR (inserto) usada na reação de ligação foi realizado pela seguinte equação:

$$\frac{\text{ng de vetor} \times \text{tamanho do inserto (kb)}}{\text{tamanho do vetor (kb)}} \times \text{taxa molar inserto:vetor}$$

A taxa molar inserto:vetor utilizada foi de 3:1.

Um controle positivo contendo DNA do inserto controle fornecido pelo fabricante e um controle negativo sem a presença de inserto de DNA foram realizados, segundo instruções do fabricante.

As reações foram misturadas por pipetagem e incubadas "overnight" a 4°C para obter-se uma maior eficiência de ligação.

3.5.2 Transformação das células competentes

As células competentes de *Escherichia coli* DH5α utilizadas para transformação foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Genética de Microrganismos, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

Em tubos falcon de 15 mL, mantidos em gelo, foram adicionados 2 μ L e 4 μ L de cada reação de ligação, sendo, em seguida, adicionados 50 μ L de células competentes em cada tubo. Duas concentrações de reação de ligação foram utilizadas para assegurar uma boa eficiência de transformação. As células competentes foram removidas do freezer -70°C e descongeladas em banho de gelo por aproximadamente 5 min. antes de serem utilizadas. As células foram misturadas com a reação de ligação agitando-se os tubos cuidadosamente e estes foram mantidos em gelo por 20 min.. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a exatamente 42°C por 50 segundos e, imediatamente, estes foram retornados ao gelo durante 2 min.

Aos tubos foram adicionados 950 μ L de meio SOC e estes foram incubados durante 2,5 horas, a 37°C, com agitação de 180 rpm. O meio SOC foi preparado do seguinte modo: 20g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 0,5g de NaCl e 0,19g de KCl foram pesados e o volume completado com água para 1000 mL, pH 7. O meio foi autoclavado a 120°C, por 20 min. Para cada 10 mL de meio foram adicionados 200 μ L de uma solução de glicose 1M e 100 μ L de uma solução de MgCl₂ 1M, ambas esterilizadas por filtração foram adicionadas ao meio. Um tubo contendo 0,1ng de plasmídeo fechado foi feito para determinar a eficiência de transformação das células competentes.

3.5.3 Cultivo dos clones

Para cada reação de ligação foram preparadas 10 placas de petri de 14 cm de diâmetro contendo meio 2TY (Tryptona-Levedura)/Ampicilina/IPTG/X-GAL. O meio 2TY (16 g/L de triptona, 10 g/L de extrato de levedura; 5 g/L de NaCl; 10 g/L de agar, pH 7) foi autoclavado a 120°C, durante 20 min e, após resfriamento, foi adicionada Ampicilina (50 μ g/mL), esterilizada por filtração, para uma concentração final de 50 μ g/mL. Após a solidificação do meio, 100 μ L de IPTG (0,240 g dissolvidos em 5 mL de água) esterilizado por filtração e 100 μ L de X-GAL (0,05 g dissolvidos em 1 mL de N'N'dimetil

formamida) foram espalhados sobre o meio com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada. As placas foram mantidas a 37°C até o momento do uso.

Após o crescimento das células, 150µL da cultura de células transformadas foram cultivados por placa de petri. As células foram espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada. As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas e, após este período, as placas foram mantidas a 4°C para facilitar a visualização e a seleção das colônias azuis/brancas.

3.5.4 Seleção e estoque dos clones

Foram construídas duas bibliotecas, correspondentes ao fragmento do gene 16S rDNA de bactérias, a G (amostra de Guariba representando os solos intensamente cultivados) e a LS (representando o solo sob floresta). Os clones foram coletados com palitos esterilizados, e cultivados em 150 µL de meio CG ("CircleGrow") (40 g do meio CG dissolvido em 1000 mL de água) adicionado de Ampicilina 50 mg/mL (para cada 100 mL de meio foi acrescentado 100 µL de antibiótico). As microplacas foram seladas com filme adesivo e cada poço foi perfurado com agulha estéril para aeração da bactéria. Os clones foram crescidos durante 22 horas, a 37°C, com agitação de 180 rpm.

Após o repique das bactérias, foram adicionados 150 µL de glicerol 40% (40g de glicerol, completar o peso para 100g com água e autoclavar por 20 min. a 120 °C) a todas as microplacas. Estas foram seladas com filme adesivo selador para microplacas, embaladas em filme plástico e estocadas a -70°C.

3.5.5 Crescimento dos clones

Após este período, os clones foram replicados em placas de cultivo de bactérias ("Mega Titer") de 96 lugares, contendo 1 mL de meio CG adicionado de Ampicilina 50 µg/mL. As placas foram seladas com filme adesivo e cada poço perfurado com agulha estéril para permitir aeração. Os clones foram cultivados durante 22 horas, a 37°C, com agitação de 200 rpm.

3.6. Seqüenciamento

3.6.1 Extração do DNA plasmidial

As placas, com os clones crescidos, foram centrifugadas em centrífuga "eppendorf", modelo 5810R, por 8 min., a 4°C, a 3220 x g. Os sobrenadantes foram descartados e as placas invertidas foram secas em papel absorvente. A cada poço adicionou-se 240 µL de tampão GTE (Glicose 50mM; Tris 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0). As placas foram seladas com filme adesivo selador para microplacas e agitadas em "vortex" até que as células fossem ressuspensas. Em seguida, estas foram centrifugadas por 6 min., a 4°C, a 3220 x g, os sobrenadantes foram descartados e as placas invertidas foram secas em papel absorvente. A cada poço foi adicionado 85 µL de uma solução GTE/RNase (80 µL de solução GTE acrescida de 5 µL de solução de RNase 10 mg/mL). As placas foram seladas e agitadas em "vortex" para que as células fossem ressuspensas. A solução de RNase (10 mg/mL) foi preparada do seguinte modo: 40 mg de RNase A foram dissolvidos em 4 mL de Tris-HCl 10 mM, pH 8 contendo 15 mM de NaCl. Essa solução foi mantida em banho-maria fervente durante 10 min. para inativar a DNase, e em seguida, estocada em alíquotas a -20°C.

A seguir foram transferidos 60 µL da solução para microplaca de 250 µL e adicionados 60 µL de solução de lise (NaOH 0,2N; SDS 1%). As placas foram seladas e a solução misturada por inversão por 10 vezes e, em seguida, centrifugadas brevemente para que a solução fosse depositada no fundo da placa. As placas foram

incubadas por 10 min., a temperatura ambiente. 60 μ L de uma solução de Acetato de Potássio 3 M, pH 4.8 gelado (29,44 g de KOAc foram dissolvidos em 60 mL de água e adicionados 11,5 mL de ácido acético glacial; o volume foi completado para 100 mL com água) foram adicionados aos poços. As placas foram seladas e a solução foi misturada por inversão por 10 vezes e novamente, as placas foram incubadas por 10 min., a temperatura ambiente. Os adesivos foram removidos e as placas incubadas exatamente por 30 min. em estufa a 90°C. Estas foram, novamente, seladas, resfriadas em gelo por 10 min. e centrifugadas por 8 min., a 20°C, a 3220 x g.

Em nova microplaca foram encaixados filtros e o conjunto foi fixado com fita adesiva. Aproximadamente, 170 μ L da solução do lisado foram transferidos cuidadosamente para o filtro, evitando-se coletar o precipitado. Os filtros foram selados e o conjunto foi centrifugado por 6 min., a 20°C, a 3220 x g. O filtro foi removido e 110 μ L de isopropanol absoluto foram adicionados ao filtrado. As placas foram seladas e a solução misturada por inversão. Em seguida, estas foram centrifugadas por 45 min., a 20°C, a 3220xg. O sobrenadante foi descartado, e as placas invertidas foram secas em papel absorvente. Foram adicionados 200 μ L de etanol 70% gelado às placas e estas centrifugadas por 5 min., a 20°C, a 3220xg. Estas foram invertidas, secas em papel absorvente e brevemente centrifugadas até 350xg. As placas foram, então, deixadas em temperatura ambiente aproximadamente por 1 hora para secarem e, posteriormente, o DNA foi ressuspenso em 50 μ L de água milli-Q autoclavada. As placas foram seladas e mantidas "overnight", a 4°C, para posterior quantificação do material.

3.6.2 Quantificação do DNA plasmidial

Uma alíquota de 3 μ L de DNA adicionada de 3 μ L de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol) foi aplicada em gel a agarose de 1% gel. Um DNA de concentração conhecida (50 ng/ μ L) foi aplicado em diferentes volumes para comparação visual da intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídio e cálculo da concentração do material.

A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba modelo HORIZON 58 (GIBCO HORIZONTAL GEL ELECTROPHORESIS) e conduzida em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/mL), durante 1 hora e 30 min., a 100V constante. O DNA plasmidial foi visualizado sob luz UV e documentado em um fotodocumentador modelo GEL DOC 1000 (BIO-RAD).

3.6.3 PCR de seqüenciamento

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

- 0,4 µL de BigDye Terminator;
- 3,2 pmoles dos iniciadores “forward”,
- 2µL de tampão 5X (400 mM Tris-HCl, pH 9; 10 mM MgCl₂);
- 100 ng de DNA;
- água milli-Q esterilizada por filtração para completar o volume final para 10 µL.

Para a PCR de seqüenciamento foi utilizado o oligonucleotídeo universal M13/pUC 1211 ("forward") , cuja seqüência está abaixo descrita:

- M13/pUC 1211: 5' - GTA AAA CGA CGG CCA GT -3'

As placas foram fechadas com um adaptador de silicone e levadas ao termociclador seguindo o programa: 1 ciclo a 96°C por 2 min. e 40 ciclos (96°C por 10 s, 52°C por 20 s e 60°C por 4 min.).

3.6.4 Precipitação e lavagem das reações de seqüenciamento

Após a reação de seqüenciamento, os fragmentos de DNA amplificados foram precipitados e os dNTP's marcados por fluorescência não incorporados aos fragmentos de DNA recém-sintetizados foram retirados por sucessivas lavagens.

Para a precipitação do DNA amplificado foram adicionados 80 µL de isopropanol 75% às amostras e estas foram agitadas, cuidadosamente, em "vortex" por alguns segundos. As placas permaneceram em temperatura ambiente por 15 min. e, em seguida, foram centrifugadas durante 45 min., a 3220 x g, a 15°C. Os sobrenadantes foram descartados. As placas foram invertidas e secas em papel absorvente. Em seguida, 150 µL de etanol 70 % foram adicionados em cada poço e as placas foram centrifugadas por 5 min. a 23°C, a 3220 x g. Os sobrenadantes foram descartados, as placas invertidas em papel absorvente, novamente, foram acrescentados 150 µL de etanol 70 % em cada poço. As placas foram centrifugadas por 5 min., a 23°C, a 3220 x g. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e as placas invertidas em papel absorvente. Nova lavagem foi realizada e, em seguida, as placas foram centrifugadas brevemente e invertidas para eliminar o resíduo de isopropanol. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por aproximadamente 30 min., e, posteriormente, embrulhadas em filme plástico e acondicionadas a -20°C até o momento de serem aplicadas no seqüenciador.

3.6.5 Preparo da amostra e seqüenciamento do fragmento

Posteriormente as amostras foram ressuspendidas em 9 µL de formamida (ABI Prism - 4311320) e desnaturadas a 95°C por 5 min.. Os fragmentos foram seqüenciados em um aparelho ABI3700 – Applied Biosystems, em sistema capilar.

3.7 Análise das seqüências

3.7.1 Identificação dos clones

Após o seqüenciamento das amostras, a imagem do gel foi analisada pelo programa "Sequencing Analysis 3.4", que gerou os eletroferogramas das seqüências. Os eletroferogramas foram submetidos ao pacote de programas "Phred/Phrap/Consed" (GORDON et al., 1998) para analisar a qualidade das seqüências, visualizar o resultado graficamente e gerar os arquivos no formato fasta (seqüência de bases antecida pelo sinal ">" e seu nome). Estes arquivos foram analisados pelo programa Contgen.pl e tiveram as seqüências menores que 100 nucleotídeos com qualidade superior a 20 descartadas, para permitir maior confiabilidade nos resultados. Posteriormente as seqüências no formato fasta foram submetidas ao programa BLAST - "Basic Local Alignment Search Tools" (ALTSCHUL et al., 1997), executado no LBMP (Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas) em uma Workstation SUNBLADE 1000 (SUN Microsystems), comparando-se as seqüências, obtidas via internet, com as seqüências depositadas no banco de dados público mundial (GenBank - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

O programa "BLAST" verificou a identidade do material que foi seqüenciado, confrontando com seqüências já existentes no banco de dados, retornando um relatório com os resultados contendo a identificação da seqüência de cada clone, valores de identidade, "score", "e-value" e alinhamento das seqüências.

3.7.2 Análise da diversidade

Posteriormente, o arquivo de saída do "Blast" foi analisado por um programa em "Perl" (Practical Extraction and Reporting Language - Linguagem Prática para Extração e Relatórios) desenvolvido no laboratório. Esse programa descartou seqüências que possuíam valor de "score" inferior a 120 ou "e-value" maior do que 10^{-30} , eliminando seqüências de baixa qualidade e permitindo maior confiabilidade nos resultados.

O mesmo programa cadastrou os dados em um banco de dados metagenômico, feito em MySQL (Sistema de Gerenciamento de Banco de Dados Relacional), também criado no laboratório, para facilitar as comparações entre a diversidade dos dois solos.

3.7.3 Preparação da árvore filogenética

As seqüências dos clones distintos foram recuperadas do banco de dados metagenômico e alinhadas através do programa ClustalX (THOMPSON, J.D. et al 1997), com os seguintes parâmetros: Pairwise Alignment (Gap opening 10.00, Gap Extension 0.10), Multiple Alignment (Gap opening 10.00, Gap Extension 0.10).

A matriz de distância foi construída utilizando-se o algoritmo Jukes-Cantor (JUKES e CANTOR, 1969) e os filogramas foram construídos através do método neighbor-joining (SAITOU, N. e M., NEI., 1987), utilizando-se o pacote MEGA2 (KUMAR et al. 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de extração de DNA do solo forneceu DNA adequado para restrição enzimática, amplificação por PCR e clonagem em vetor. A avaliação da qualidade do DNA extraído do solo realizada por digestão enzimática, com uma enzima de restrição de corte freqüente, resultou em um arraste quando visualizado em gel, confirmando o corte do DNA em vários fragmentos de tamanhos diferentes e a boa qualidade do DNA, uma vez que impurezas na preparação resultaria na observação de um DNA íntegro no gel.

A amplificação por PCR da região 16S rDNA demonstrou ser eficiente para avaliação de bactérias no solo gerando o fragmento de tamanho esperado, com predominância de bactérias. A verificação de seqüências quiméricas foi realizada manualmente através do programa "Consed" (GORDON et al., 1998). Nenhuma seqüência quimérica foi detectada. Todas as seqüências já se apresentavam cadastradas no banco de dados "GenBank". A taxa de similaridade das seqüências de ambos os solos analisados variou de 77 a 100 % em relação ao "GenBank", como pode ser observado nas Figuras 1 a 4 e nas Tabelas 4 e 5 (Apêndice, pág.59). A purificação do produto da amplificação do gene 16S rDNA removeu completamente o gel, permitindo a obtenção de DNA com elevado grau de pureza para ser usado na reação de clonagem.

Na reação de clonagem os fragmentos de PCR não foram direcionalmente inseridos no vetor pGEM-T, como resultado seqüências de finais invertidos foram obtidas. Como houve apenas o seqüenciamento parcial do gene 16S rDNA, no sentido "forward", o alinhamento realizado pelo Clustal X não apresentou a sobreposição necessária para a construção do filograma, sendo por esse motivo necessário à construção de mais de um filograma por solo analisado. As seqüências representando o final 3' da molécula 16S rDNA são apresentadas nas Figuras 1 e 3 (parte 1), enquanto as de finais 5' são apresentadas nas Figuras 2 e 4 (parte 2).

Um total de 480 clones foi seqüenciado de duas bibliotecas, sendo 240 clones para cada uma, representando os dois solos analisados. As seqüências atingiram uma média de aproximadamente 1000 pb (pares de bases).

Desse total, 56 clones seqüenciados apresentaram eletroferogramas de baixa qualidade que, quando submetidos à análise pelo programa BLAST, para identificação das seqüências dos clones, geraram resultados com valores de “e-value” e “score” que estavam abaixo dos parâmetros de qualidade estabelecidos. Por esse motivo foram descartados.

Na biblioteca LS, representante do solo sob floresta, 183 clones superaram os valores mínimos de “score” estabelecido em 120 com mais de 50 % de identidade. Todas as seqüências analisadas encontravam-se registradas no banco de dados “GenBank”. Do total de seqüências, 120 são de diferentes organismos, ou seja, estão cadastrados como seqüências diferentes. Na biblioteca G, representando o solo sob cultivo, 141 seqüências foram aprovadas no critério descrito acima, onde 85 eram de diferentes organismos.

Nas Tabelas 4 e 5 (Apêndice) podemos observar todos os clones seqüenciados nos dois solos, identificados através do BLAST, com seus respectivos “geneid” (código para a identificação da seqüência fornecido pelo NCBI), nome da seqüência depositada no banco, número para identificação da seqüência no filograma, número total de clones observados em cada solo e a respectiva freqüência em porcentagem. Também é possível verificar que os clones de nº17,76,112 do solo sob floresta da Tabela 4 e o clone de nº 26 da Tabela 3 (solo sob cultivo), não estão no filograma por terem apresentado problemas no alinhamento.

Para proposta de identificação daqueles organismos que não puderam ser identificados diretamente através do BLAST, a construção dos filogramas demonstrou-se razoavelmente adequada. Algumas das seqüências de 16S rDNA de bactérias cadastradas no “GenBank” não são completamente descritas, informando apenas que são bactérias de solo, sendo por esse motivo necessário o uso de filogramas para tentar identificar os filos dessas bactérias. Na biblioteca do solo sob cultivo (biblioteca G), os filogramas permitiram a identificação de 11% das seqüências de organismos

desconhecidos, através de agrupamento com filos conhecidos, enquanto na biblioteca do solo LS esse valor foi de 10%.

Estudos anteriores sobre diversidade ambiental que usaram filogramas criados através do agrupamento por “neighbor-joining” e seqüências parciais de 16S rDNA apóiam este tipo de aproximação (BORNEMAN et al. 1996, MACGAIG et al., 2001; SMIT et al., 2001). Embora alguns braços da árvore apresentem comprimentos diferentes, os grupos estabelecidos são os mesmos. O seqüenciamento parcial foi justificado, visto que o objetivo era analisar a diversidade de procariotos no solo, e não realizar um estudo filogenético.

Através do programa BLAST e posterior análise realizada no MEGA2 foi possível identificar no solo sob cultivo 61 bactérias diferentes pertencentes a seis filos. As 25 seqüências de bactérias restantes não foram agrupadas a nenhum filo conhecido (Figuras 1, 2, 5 e 6).

Já no solo sob floresta, 81 diferentes bactérias foram identificadas representando sete filos e 1 representante do domínio *Archaea* (Tabela 4), sendo que as outras 39 seqüências não foram agrupadas com nenhum filo conhecido, como mostram as Figuras 3, 4, 5, 6.

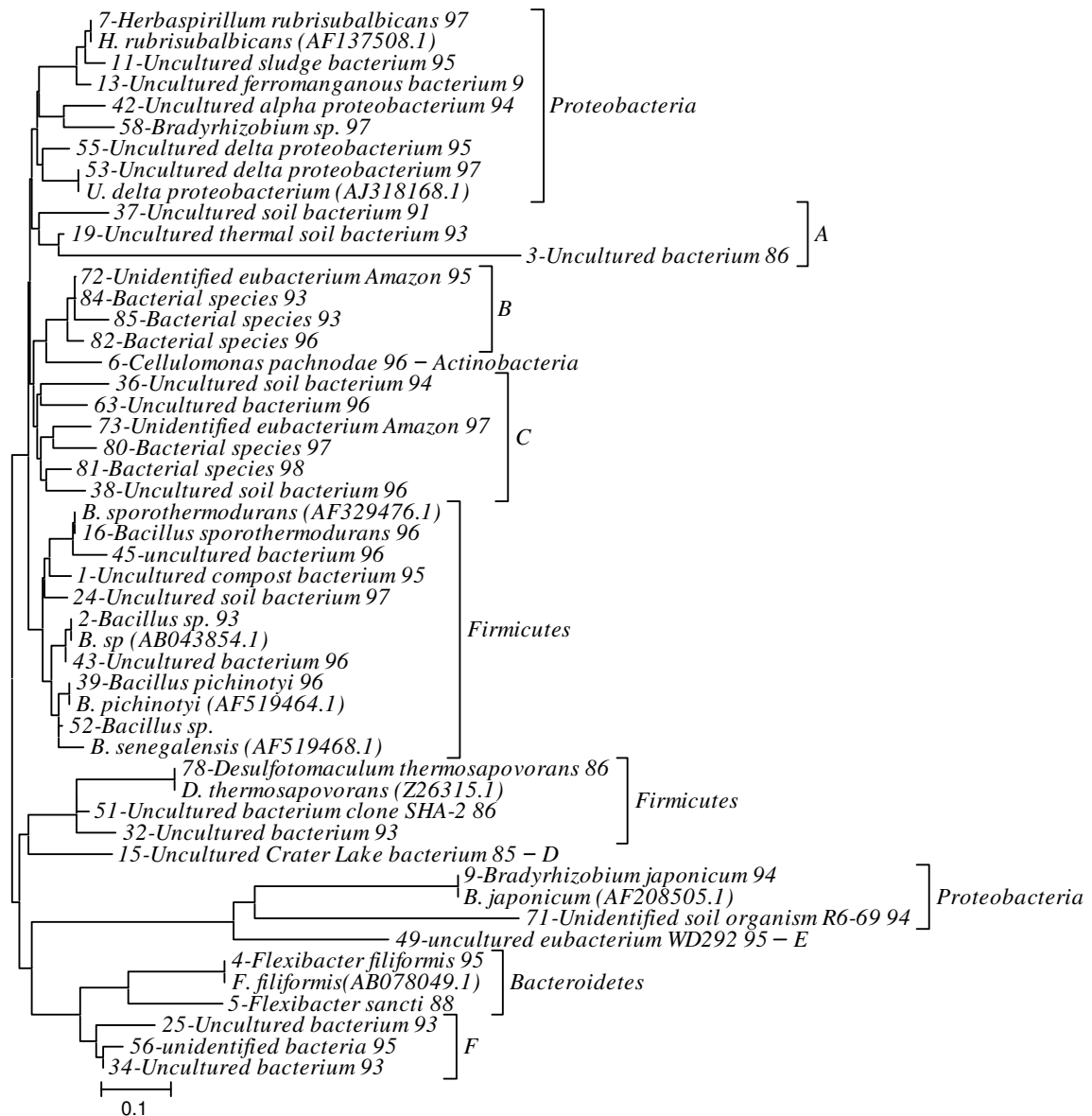


Figura 1. Filograma de seqüências parciais de 16S rDNA, final 3', amplificadas da biblioteca G (solo cultivado), parte 1. Clades de A a F não formaram grupo com nenhuma seqüência de filo conhecido. Todas as seqüências obtidas dos clones foram enumeradas. O valor entre parênteses mostra o nº de acesso da seqüência do "GenBank". A similaridade entre as seqüências dos clones e as do "GenBank" está indicada em porcentagem, determinada pelo "Blast", após o nome das seqüências.

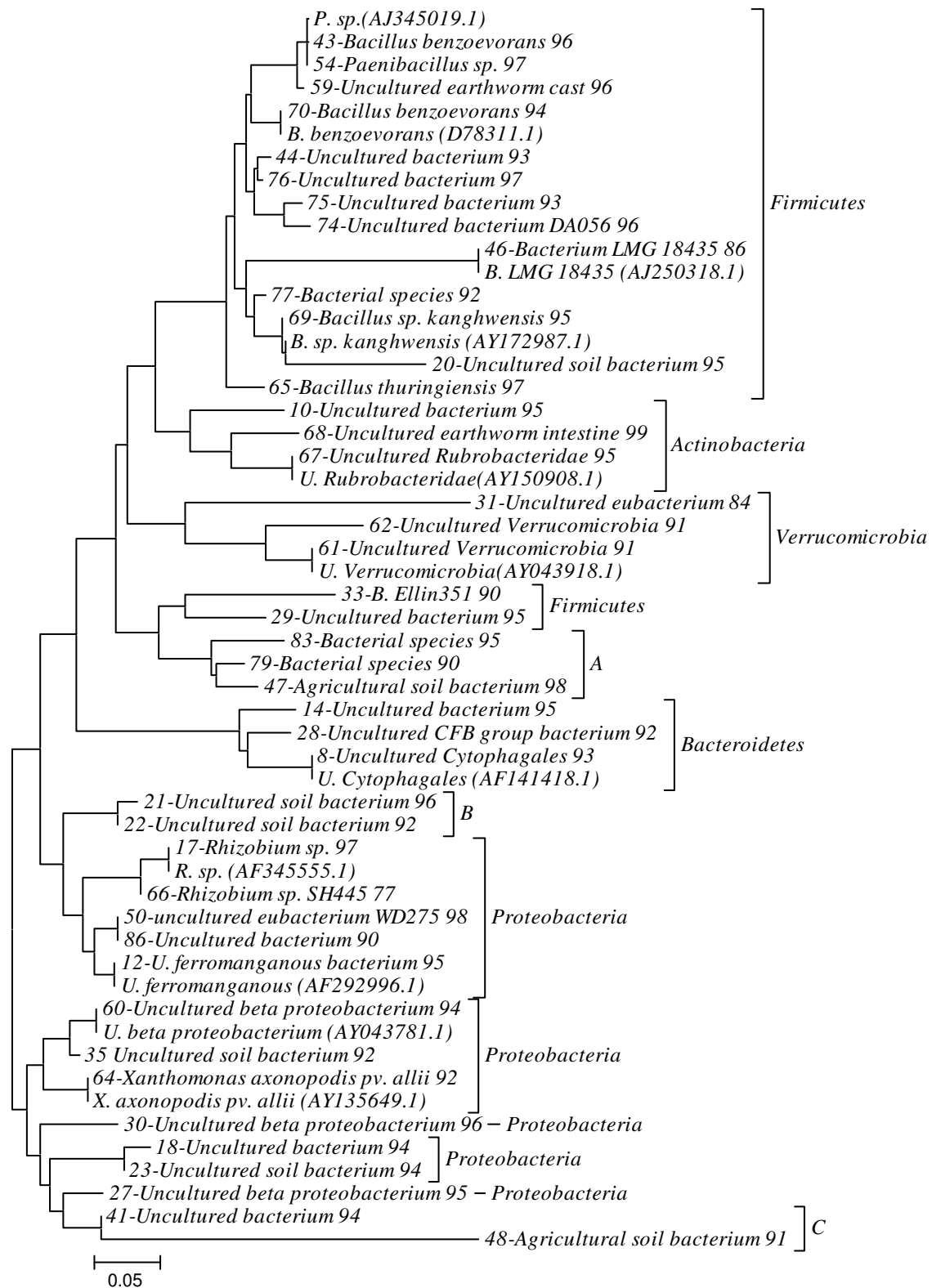


Figura 2. Filograma de seqüências parciais de 16S rDNA , final 5', amplificadas da bilblioteca G (solo cultivado) – parte 2. Clades de A a C não formaram grupo com nenhuma seqüência de filo conhecido. Todas as seqüências obtidas dos clones foram enumeradas. O valor entre parênteses mostra o nº de acesso da seqüência do “GenBank”. A similaridade entre as seqüências dos clones e as do “GenBank” está indicada em porcentagem, determinada pelo “Blast”, após o nome das seqüências.

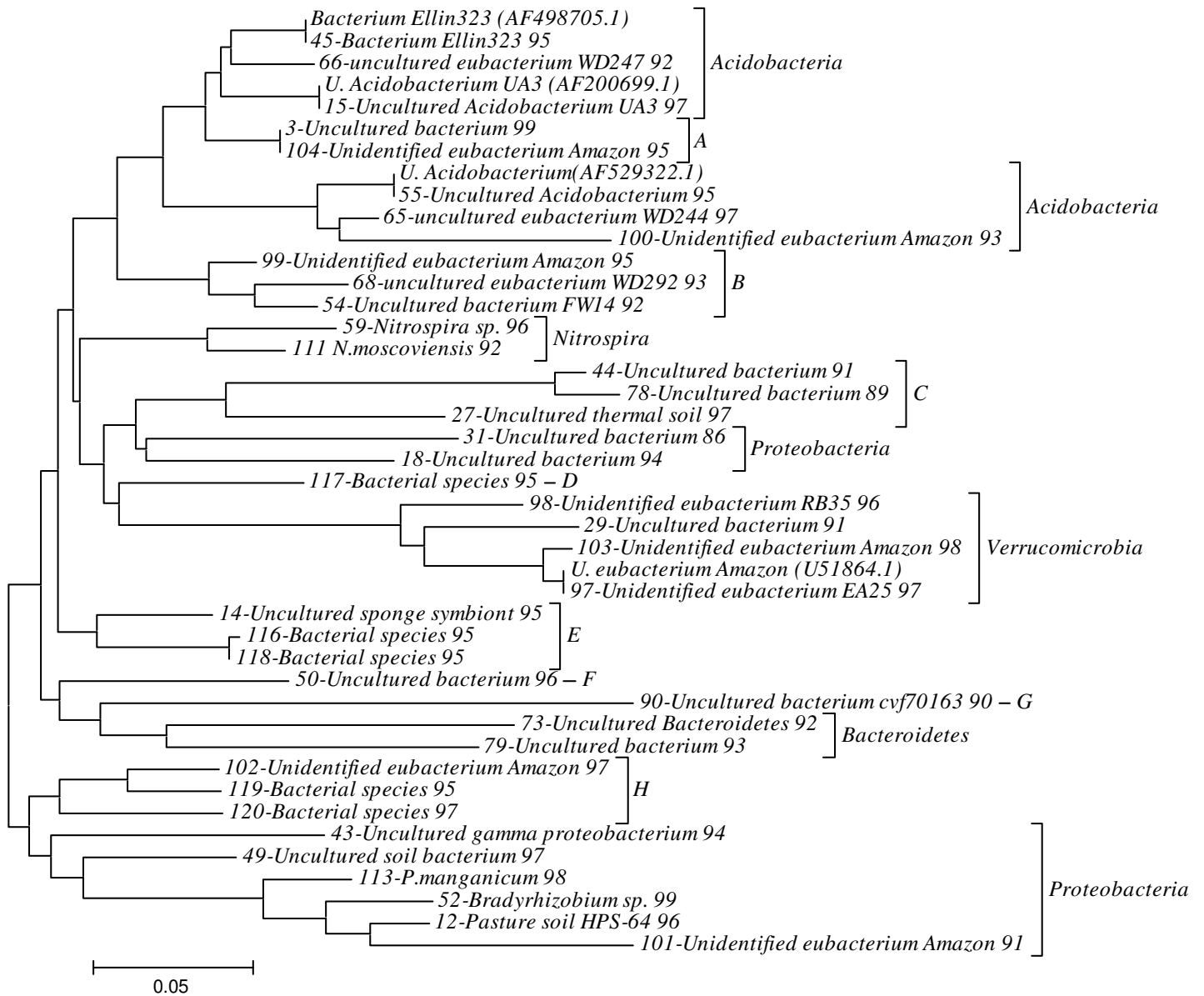


Figura 3. Filograma de seqüências parciais de 16S rDNA, final 3', amplificadas da biblioteca LS – parte 1. Clades de A a H não formaram grupo com nenhuma seqüência de filo conhecido. Todas as seqüências obtidas dos clones foram enumeradas. O valor entre parênteses mostra o nº de acesso da seqüência do "GenBank". A similaridade entre as seqüências dos clones e as do "GenBank" está indicada em porcentagem, determinada pelo "Blast", após o nome das seqüências.

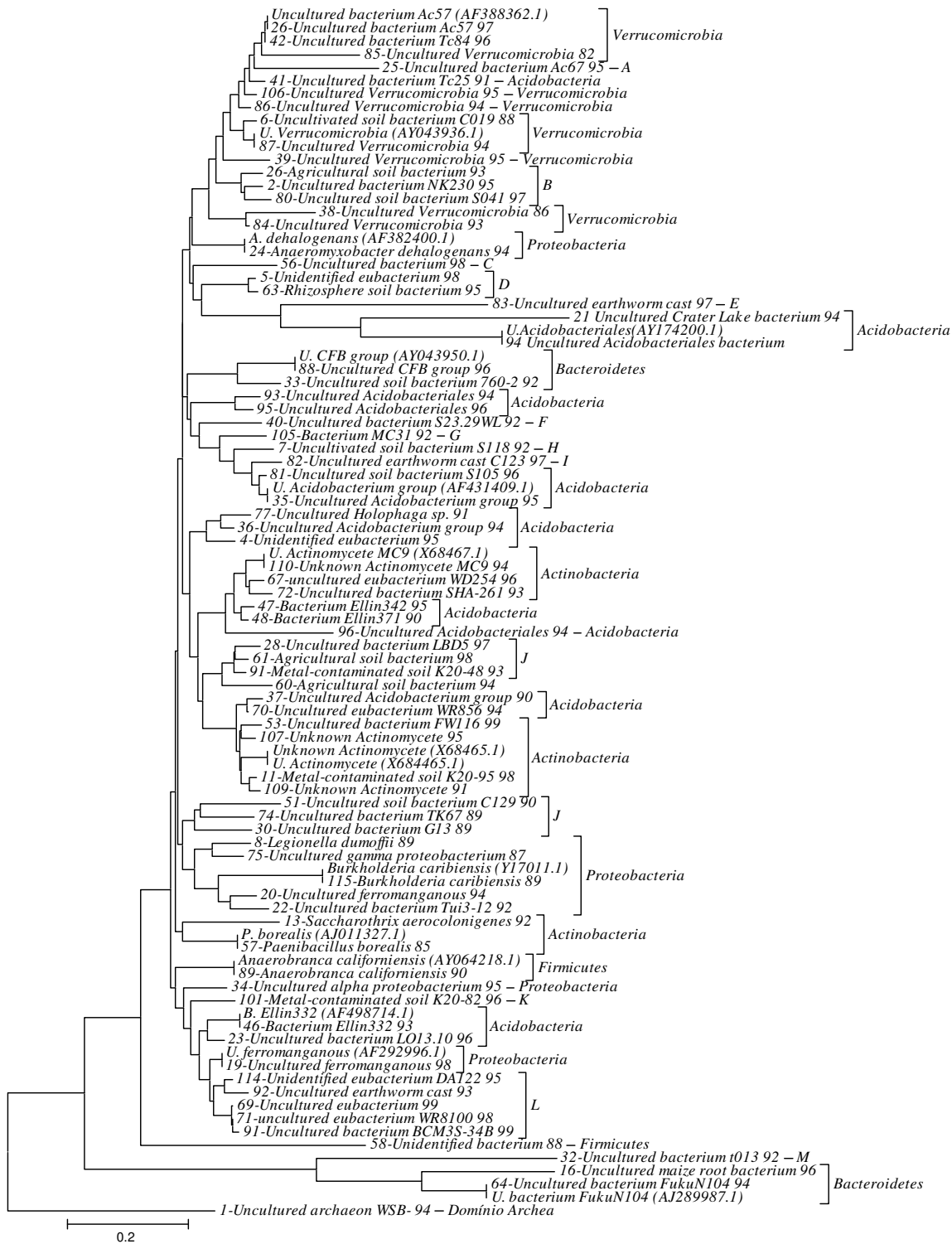


Figura 4 Filograma de seqüências parciais de 16S rDNA , final 5', amplificadas da biblioteca LS – parte 2. Clades de A a M não formaram grupo com nenhuma seqüência de filo conhecido. Todas as seqüências obtidas dos clones foram enumeradas. O valor entre parênteses mostra o nº de acesso da seqüência do "GenBank". A similaridade entre as seqüências dos clones e as do "GenBank" está indicada em porcentagem, determinada pelo "Blast", após o nome das seqüências.

Pouco menos de um terço de todos os clones não se agrupou nos filios conhecidos do domínio *Bacteria*. Como muitas bactérias do solo não são cultiváveis não é surpreendente que isto aconteça. A vasta maioria de trabalhos envolvendo estimativas de diversidade de bactérias no solo relata diferentes quantidades de microrganismos que não podem ser agrupados a nenhum filo conhecido, independente das técnicas de análise utilizadas. Isto sugere que o domínio *Bacteria* ainda possui muitos novos filios a serem caracterizados (DUNBAR et al., 2002; HUGENHOLTZ et al., 1998).

Os filios que apresentaram o maior número de bactérias diferentes no solo sob floresta foram *Acidobacteria* (26,8%), *Verrucomicrobia* (14,8%) e *Proteobacteria* (9,8%). Em seguida, um número menor de representantes dos seguintes filios estão presentes, como *Actinobacteria* (4,4%), *Bacteroidetes* (2,7%), *Firmicutes* (1,1%), *Nitrospira* (1,1%) e representantes da Domínio *Archaea* (0,5%).

No solo sob cultivo os filios que mais se destacaram foram *Proteobacteria*, com 28,6%, e o filo *Firmicutes*, com 27,1%. Em menor número estavam presentes os filios *Bacteroidetes* (4,3%), *Actinobacteria* (3,6%), *Verrucomicrobia* (1,4%) e *Acidobacteria* (0,7%).

As bactérias pertencentes ao filo *Acidobacteria* foram as que mais se destacaram no solo sob floresta, apresentando 26 diferentes seqüências, somando um total de 49 (representando uma freqüência de 26,8%).

Uma das possíveis razões da significativa presença das bactérias do filo *Acidobacteria* pode ser devido à elevada acidez do solo sob floresta (pH 4,9 em CaCl_2) e ao fato de as bactérias pertencentes a esse filo desenvolverem-se melhor nesse tipo de ambiente. No entanto, esse filo proposto em 1995 (HIRASHI et al., 1995) ainda é pouco conhecido e estudos ambientais relatam a ocorrência de seqüências desse filo em diversos ecossistemas. Há relatos da presença de organismos pertencentes a esse filo, principalmente em comunidades do solo, como solo vulcânico, agricultável, floresta e áreas sob pinus. Além disso, também foi observado em sedimentos de pântano, rios e fontes termais, sugerindo que esses microrganismos são componentes

ecológicos significativos, o que pode ser observado neste estudo e em outros trabalhos (HUGENHOLTZ et al., 1998; SMIT et al., 2001; DUNBAR et al., 2002).

No solo sob cultivo, o número de bactérias pertencentes ao filo *Acidobacteria* foi sensivelmente menor, representando uma frequência total de apenas 1,2% (1 clone). Entre todos os táxons presentes no estudo, o que sofreu o maior impacto das alterações ambientais devido a práticas agrícolas foi o filo *Acidobacteria*. Possivelmente devido ao pH do solo, que estava bem mais elevado (6,2 em CaCl_2) do que o solo sob floresta, devido a uma operação de calagem. Esse dado corrobora as observações de HIRASHI et al. (1995) quanto ao melhor desenvolvimento dessas bactérias em ambientes com meio ácido.

O segundo filo com maior número de representantes no solo sob floresta foi o *Verrucomicrobia*. Representou 14,8% de clones totais (27 clones), com 14 seqüências diferentes. Proposto em 1997 (HEDLUND, et. al., 1997), o filo *Verrucomicrobia* possui representantes amplamente distribuídos na natureza, principalmente no solo, assim como o filo *Acidobacteria*.

Estimativas obtidas pelo método de PCR quantitativo para alguns representantes desse filo, como a linhagem EA25, em uma área de pastagem de Washington (USA), são da ordem de $1,4 \times 10^7$ a $1,95 \times 10^8$ células por grama de solo, o que equivale a aproximadamente 1 a 10 % da contagem microbiana total (LEE et. al., 1996).

Representantes desse filo, como a espécie *Verrucomicrobium spinosum*, entre outras, foram relatados na água fresca, no ambiente marinho e, principalmente, solo (HUGENHOLTZ et. al. 1998). Curiosamente a espécie acima mencionada, que pode ser vista na tabela 4, com o número 113 no apêndice, é encontrada nesse solo, reforçando a observação da natureza cosmopolita da maioria das bactérias. Um número constante de representantes do filo foi observado também nos solos de pastagem e sob floresta na Amazônia (BORNEMAN e TRIPLETT 1997).

No solo sob cultivo, o número de representantes do filo *Verrucomicrobia* caiu consideravelmente, como pode ser observado na Figura 5, representando apenas 1,4% do total de clones do solo. Esses dados indicam que a agricultura interfere diretamente na quantidade de organismos desse filo.

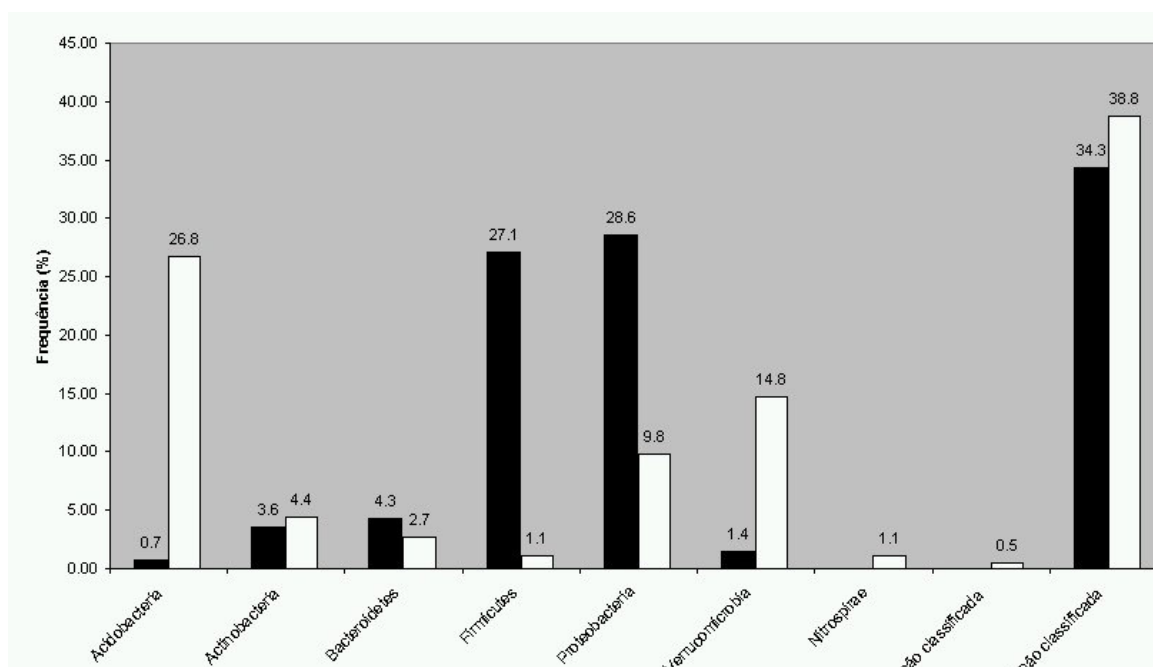


Figura 5 – Frequência em porcentagem de clones totais observados nos solos sob cultivo (colunas pretas) e sob floresta (colunas brancas).

O terceiro táxon com maior número de representantes no solo sob floresta é o filo *Proteobacteria*, representando um total de 9,8% de clones totais (18 clones), com 17 seqüências diferentes. Constituem o maior e mais diverso grupo de bactérias cultivadas, apresentando grande diversidade de morfologia e metabolismo. Devido a essas características, ocorrem nos mais diversos ambientes, justificando sua presença em um solo sob floresta. Um grande número de trabalhos também detectou a presença dos membros desse filo nos mais variados ambientes (HUGENHOLTZ et al., 1998; DUNBAR et al., 1999; SESSTISCH et al., 2001; SMIT et. al., 2001).

Contudo, ocorrem predominantemente em solos cultivados, o que pode ser observado nas figuras 5 e 6. Representantes do filo estão presentes, como pode ser observado nas Figuras 1, 2, 3 e 4, além da Tabela 2 e Tabelas 4 e 5 do apêndice.

No solo sob cultivo esse filo apresenta-se com 28,6% dos clones totais (40 clones), com 21 seqüências diferentes, sendo o filo com maior número de representantes.

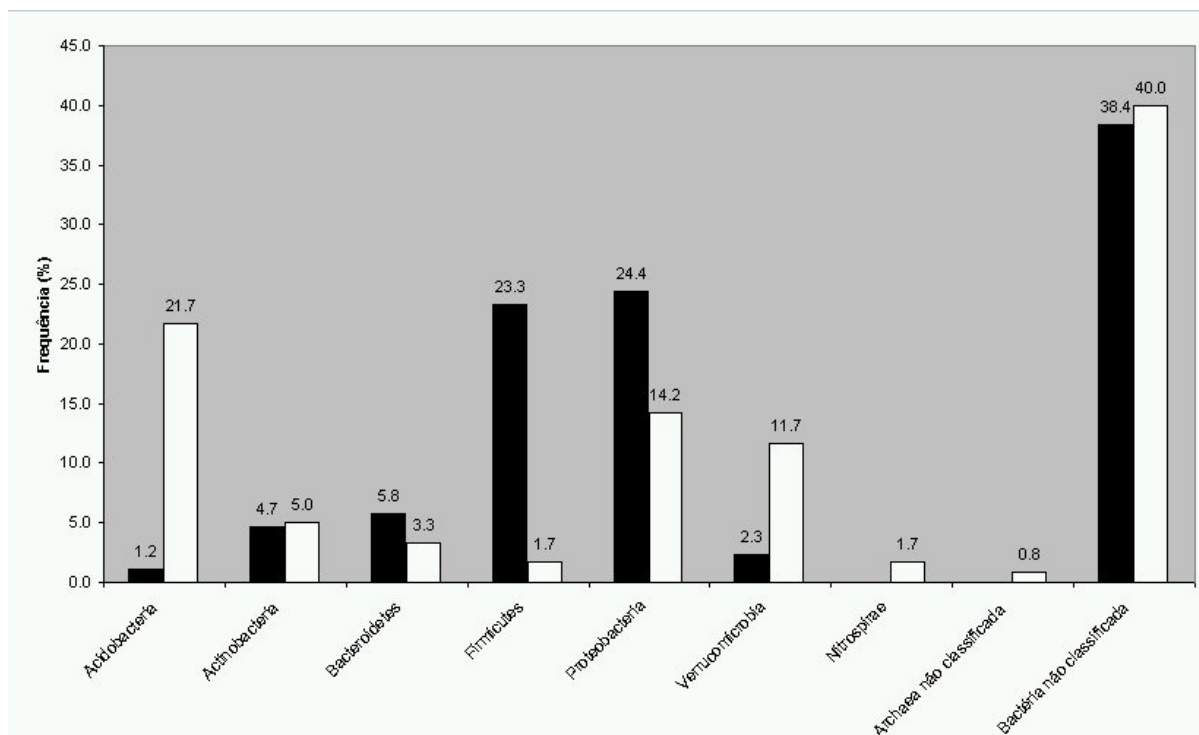


Figura 6 – Frequência de filos em porcentagem de clones únicos observados nos solos sob cultivo (coluna preta) e sob floresta (coluna branca).

Diversos fatores podem estar relacionados a maior presença das bactérias pertencentes ao filo *Proteobacteria* no solo sob cultivo. O primeiro é que aparentemente bactérias pertencentes à classe *Alphaproteobacteria* desenvolvem-se melhor em solos contaminados por metais pesados, nos quais outras bactérias têm sua população reduzida.

O exame da comunidade bacteriana de solos contaminados por metal pesado relatou que várias comunidades bacterianas eram afetadas diretamente pela contaminação, sendo reduzidas ou mesmo desaparecendo do solo. Por outro lado, a classe *Alphaproteobacteria* aumentava significativamente, indicando que as bactérias pertencentes a essa classe poderiam ter vantagens significativas sobre outras bactérias em um solo com alto conteúdo de metais pesados (SANDAA et al. 1998).

A análise da diversidade microbiana avaliada por bibliotecas de clones de 16S rDNA de duas pastagens, sobre diferentes aplicações de fertilizantes, revelou que

ambas as áreas foram dominadas por representantes da classe *Alphaproteobacteria* (MACGAIG et al. 1999).

A observação das altas taxas de crescimento das bactérias pertencentes à classe *Alfaproteobacteria* em solos com alto conteúdo de nutrientes disponíveis indica que as mesmas sejam “estrategistas r” (SMIT et. al. 2001). A verificação de que o número desta classe de bactérias é maior no solo sob cultivo do que no solo sob floresta (Tabela 2) está em concordância com os estudos acima mencionados.

Tabela 2 – Análise da classe *Alphaproteobacteria* realizada através do “Blast” e filogramas.

Solo	Filo	Classe	Identificação dos clones	Frequência Total em %
Floresta	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	10, 17, 19	2,49
Cultivado	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	9, 12, 17, 42, 58, 66	10,45

Outro fator importante a ser observado é que o tamanho da partícula tem um alto impacto na diversidade microbiana e na estrutura de sua respectiva comunidade, assim como o pH e a quantidade de matéria orgânica disponível. Analisando a distribuição espacial da comunidade bacteriana no solo observou-se que grandes partículas (areia) eram dominadas por bactérias pertencentes à classe *Alphaproteobacteria* do filo *Proteobacteria*. No presente estudo os valores de grandes partículas como areia são maiores no solo sob cultivo, confirmando observações já realizadas (SESSTISCH et al. 2001).

Alguns trabalhos relatam uma grande mudança na diversidade microbiana do solo, quando florestas são transformadas em pastagem, com significativo aumento das bactérias do filo *Proteobacteria*. (BONERMAN e TRIPLETT, 1997; NÜSSELEIN e TIEDJE, 1999). Os dados presentes neste trabalho corroboram esses relatos como pode ser observado nos Figuras 5 e 6.

Também descrito como bactéria gram-positiva com baixo teor de G+C, o filo *Firmicutes* compreende organismos com metabolismo caracterizado por homo e heterofermentações e respiração. Alguns organismos são microaerófilos, anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos. Outros são formadores de esporos, como os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* (CANHOS e VAZOLLER, 1997).

Esse filo foi altamente beneficiado pela agricultura, 27,1% de clones totais (38 clones, sendo 20 diferentes), como pode ser observado na Figura 2. Uma possível explicação é que alguns representantes desse filo, como as bactérias do gênero *Bacillus* e *Clostridium*, utilizam como estratégia de sobrevivência um rápido crescimento quando há nutrientes em quantidade necessária. Esse tipo de estratégia, da qual os integrantes do gênero *Bacillus* são um exemplo, é conhecida como estratégia r. Esses estrategistas não são bons competidores, possuindo como única vantagem adaptativa em relação a concorrentes sua rápida multiplicação. Prevalecem somente em condições em que exista grande quantidade de nutrientes disponíveis em áreas com baixa competição, tendo por esse motivo variações extremas em suas populações. Estrategistas r são geralmente encontrados em ambientes instáveis que estejam passando por transições (ATLAS, 1999).

O solo sob cultivo continuamente sofre a ação do homem através da aplicação de herbicidas, adubação e inseticidas. Também ocorrem operações como aração, gradagem e calagem no solo. Toda essa interferência provoca uma constante alteração na comunidade microbiana, o que favorece os estrategistas r.

Analisando a diversidade de bactérias no solo sob cultivo (G) na Tabela 3 abaixo, é possível verificar que o gênero *Bacillus* apresenta-se com 16 representantes distintos ("geneid" diferentes), com uma frequência total (número de clones totais) de 31 bactérias. O gênero *Clostridium*, outro estrategista r, apresenta-se com 1 representante e com frequência de 1,16%, identificado pelo número 78. Maiores detalhes podem ser observados na tabela 4 (apêndice).

Tabela 3 – Análise do gênero *Bacillus*, no solo cultivado, realizada através do “Blast” e filogramas.

Filo	Gênero	Identificação dos clones	Frequência Total em %
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	16, 39, 40, 43, 44, 46, 52, 54, 59, 65, 69, 74	29,3

Por outro lado, no solo sob floresta, a diversidade desse filo é extremamente pequena - 1,1% dos clones totais (2 clones), com duas seqüências diferentes: um da classe *Bacilli* e outro da classe *Clostridia*, nºs 57 e 89, respectivamente, da tabela 5 (apêndice). Esses dados concordam com o exposto acima sobre a estratégia de sobrevivência desses organismos e sua inabilidade quando há grande concorrência por nutrientes no solo.

Os integrantes dos filos *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*, aparentemente, não foram afetados pelas práticas agrícolas do solo sob cultivo, nem pela grande diversidade de integrantes da comunidade bacteriana do solo sob floresta.

As bactérias pertencentes ao filo *Actinobacteria* também podem ser descritas como gram-positivas com alto teor de G+C. Geralmente, são aeróbias, não são móveis na fase vegetativa e apresentam pleomorfismo em alguma fase do ciclo celular, podendo formar filamentos. Alguns membros desse filo podem ser microaerófilos ou anaeróbios obrigatórios formadores de ácido propiônico (CANHOS et. al., 1997). Apresenta-se no solo sob floresta com valores de 4,4% dos clones totais (8 clones), sendo 6 seqüências diferentes. No solo sob cultivo 3,6% dos clones totais (5 clones), sendo que 4 são seqüências diferentes.

Representantes do filo *Actinobacteria* são produtores de antibióticos de crescimento lento comumente encontrados em solos de pastagem (BORNEMAN e TRIPLETT, 1997; DUNBAR et al. 1999) e solos cultivados (LILES et al. 2003;

MACGAIG et al., 2001; BONERMAN et al., 1996), quase sempre com pequenas populações, exceção ocorrida em um solo sob cultivo com trigo, na Holanda, onde análises de seqüências de 16S rDNA resultaram em valores de mais de 70% dos clones pertencentes a esse filo (SMIT et al. 2001). No presente estudo verificou-se uma população pequena nos solos com variação entre eles, tendendo a ser levemente maior no solo sob floresta.

O filo *Bacteroidetes* também possui um pequeno número de representantes em ambos os solos - 4,3% de clones totais (6 clones), sendo 5 de seqüências diferentes no solo sob cultivo. Já no solo sob floresta esse valor passa para 2,7% de clones totais (5 clones), sendo 4 de seqüências diferentes e um filo fisiologicamente diverso, incluindo bactérias aeróbias e anaeróbias. Entre os gêneros desse filo o mais relatado em solos é o *Flexibacter*. Observado em baixas populações, já foi relatado em solos áridos dos Estados Unidos (KUSKE et al., 1997), em solo sob cultivo, solo sob floresta e sob pastagem (BORNEMAN et al., 1996; BORNEMAN et al., 1997; DUNBAR et al., 1999). Curiosamente a seqüência número 5, (tabela 4 do apêndice), encontrada no solo sob cultivo, foi primeiramente observada em um lago na Alemanha (GLOCKENER et al., 2000). Ao contrário do filo *Actinobacteria*, esse filo apresenta uma leve tendência de aumento na população do solo sob cultivo como pode ser observado nos Figuras 5 e 6.

O filo *Nitrospira* apresenta-se somente no solo sob floresta. Esse filo, composto apenas por oito espécies (GARRITY, et al., 2002), participa do solo sob floresta apenas com 1,1% (2 clones), sendo as duas seqüências de diferentes organismos - números 59 e 111, tabela 4 (apêndice). Uma pequena ocorrência desse filo foi relatada em solos áridos dos Estados Unidos (DUNBAR et al., 1999).

A ocorrência dessas seqüências, encontradas no solo sob floresta, também foi relatada primeiramente em um experimento de análise de populações microbianas em um reator biológico para tratamento de água (SCHRAMM et al., 1998). Nesse trabalho as bactérias pertencentes a este filo eram a comunidade dominante, sugerindo que sua ocorrência natural deva se dar na água.

Outra ocorrência isolada do solo sob floresta foi um representante de outro domínio. Participando apenas com 0,5% de clones totais (1 clone, nº 1 da Tabela 5), o domínio *Archaea* esteve presente com um representante.

Embora o oligonucleotídeo utilizado no trabalho seja específico para bactérias, foi possível detectar a presença de uma *Archaea*. Esses organismos vivem em condições extremas e são encontrados no solo com frequência. Esse dado reforça a diferença existente entre os solos. Entretanto, não é possível afirmar que outras bactérias do domínio *Archaea* não estejam presentes, já que o “primer” utilizado não é específico para elas.

A ocorrência do domínio *Archaea* também foi relatada tanto em solos sob pastagem como em solos cobertos por mata nativa da Amazônia (BORNEMAN e TRIPLETT, 1997).

Tanto no solo sob cultivo como no solo sob floresta também foi possível verificar um grande número de bactérias que permaneceram desconhecidas - na figura 5, 38,8% e 34,3% dos clones totais e na figura 6, 40% e 34,3%. Estes resultados reforçam a teoria de que no solo há muitas bactérias a serem identificadas.

5.CONCLUSÕES

Através da análise dos resultados obtidos foi possível concluir que:

1) O solo sob cultivo apresentou menor número de filos do que o solo sob floresta.

2) As práticas agrícolas promoveram aumento quantitativo das comunidades bacterianas pertencentes aos filos *Proteobacteria* e *Firmicutes*, ao passo que causaram uma diminuição nas comunidades pertencentes aos filos *Acidobacteria* e *Verrucomicrobia*.

6.BIBLIOGRAFIA

AMANN, R.I.; FUCHS, B. M.; BERENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford v.12, p.231-36, 2001.

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, R.M.; BARTHA, R. Microbial Evolution and Biodiversity-The origins of life. In: ATLAS, R.M.; BARTHA, R. (Ed.). **Microbial ecology: fundamentals and applications 4 th. ed.**, Menlo Park, California: Book News, 1997 p.37-9

BEARE, M.H. et al. hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. **Plant soil**, Missouri, v. 170, p. 5-22, 1995.

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.07, p. 2647-53, 1997.

BORNEMAN, J. et al. Molecular Microbial diversity of an Agricultural Soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.06, p, 1933-43, 1996.

BUCKLEY D.H., SCHIMIDT T.M. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. **Microbial Ecology**, New York , v.42, p.11-21, 2001.

BUSSE M. D et al. Glyphosate toxicity and effects of long term vegetation control on soil microbial communities. **Soil Biology Biochemistry**, Amsterdam, v.33, p.1777-89, 2001.

BUYER, S. A Soil and rhizosphere microorganism isolation and enumeration medium that inhibits *Bacillus mycoides*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1839-42, 1995.

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

CLARK, J. M. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.16, p.9677, 1988.

CULLEN, D.W. HIRSCH, P.R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. **Soil Biology Biochemistry**, Amsterdam, v. 30, nº 8/9, p. 983-93, 1998.

CURTIS, T.P., SLOAN, W.T., SCANNELL, J. W., Estimating prokaryotic diversity and its limits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.99, p.10494-499, 2002.

DAHLLOF, I. Molecular community analysis of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.13, p.213-17, 2002.

DE FEDE K. L., PANACCIONE D. G.; SEXTONE A.J. Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Soil Biology Biochemistry**, Amsterdam, v.33, p.1555-562, 2001.

DORAN, J. W.; ZEISS, M. R., Soil health and sustainable: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.15, p.3-11, 2000.

DUARTE, T et al. Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the indigenous bacterial community. **Journal Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 32, p. 21-29, 1998.

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.6, p.3035-45, 2002.

EL FANTROUSSI, S., et al. Effect of phenyl urea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.982-88, 1995.

FILSER, J.; FROMM, H.; NAGEL, R.F.; WINTER, K. Effects of previous intensive agricultural management on microorganisms and the biodiversity of soil fauna. **Plant Soil**, Missouri, v. 170, p. 123-29, 1995.

GARRITY, G.M; WINTERS, M.; SEARLES, D.B. **Taxonomic outline of prokaryotic genera Bergey's Manual^R of systematic bacteriology**. 2ed. New York: Springer-Verlag New York, Inc, 2002. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200210>>. Acesso em: 09/09/2003.

GESOLMINO, A. et al. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 38, p. 1-15, 1999.

GILLESPIE, D. E., et al. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. . **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.9, p.4301-306, 2002.

GIRVAN, M. S., et al., Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.3, p.1800-09, 2003.

GLOCKNER, F. O., et. al Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterial plankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. . **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.11, p.5053-65, 2000.

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

GRAYSTON S.J., et al. Accounting for variability in soil microbial communities of temperature upland grassland ecosystems. **Soil Biology Biochemistry**, Amsterdam, v.33, p.533-51, 2001.

HANDELSMAN, J.; et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: anew frontier for natural products. **Chemistry Biology**, Cambridge v. 5, p. 245-49, 1998.

HASSINK, J.; LEBBINK, G.; VAN VEEN, J.A. Microbial biomass and activity of a reclaimed polder soil under conventional or a reduced-input farming system. **Soil Biology Biochemistry**, Amsterdam, v.23, p. 507-13, 1991.

HATTORI, T., et al. Advances in soil microbial ecology and the biodiversity. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 72, p. 21-28, 1997.

HEDLUND, B. P.; GOSINK, J. J.; STALEY, J. T., Verrucomicrobia a new division of the Bacteria containing three new species of Prostheco bacter. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.72, p.29-38, 1997.

HIRASHI, A.; KISHIMOTO, N.; KOZAKO, Y. Phylogenetic position of the menaquinone-containing acidophilic chemo organotroph *Acidobacterium capsulatum*. **FEMS Microbiology Letter**, Amsterdam, v.132, p.91-94, 1995.

HUGENHOLTZ, P.; PITULLE, K.L.; PACE, N.R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.180, p.366-76 1998.

HUGUES, J. B. et al. Counting the uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.10, p.4399-406, 2001.

IBEKEWE A. M. et al. Impact of fumigants on soil microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.3245-57, 2001.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H. N. (Ed.). **Mammalian Protein Metabolism**, New York, Academic Press, p. 21-132, 1969.

KENNEDY, A.C.; SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant Soil**, Missouri, v. 170, p. 75-86, 1995.

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.

KOZDRÓJ, J., VAN ELSAS, J. D., Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.43, p.197-212, 2001.

KRAVE A. S., et al. Stratification and seasonal stability of diverse bacterial communities in a *Pinus merkusii* (pine) forest soil in central Java, Indonesia. **Environmental Microbiology**, Amsterdam, v.4, n.6, p. 361-73, 2002

KUMAR, S. et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, Oxford, v.17, n. 12, p.1244-45, 2001.

KUSKE, C. R.; BARNS, S. M.; BUSCH, J. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.9, p.3614-21, 1997.

LANE, D.J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.82, p.6955-59, 1985.

LEE, S.Y. et al. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p. 3787-93, 1996.

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

LIESACK W.; STACKBRANDT E. Occurrence of novel groups of domain bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from Australian terrestrial environment. **Journal Bacteriology** v.174, p.5072-78, 1992.

LILES, M. R. et al. A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.69, p.2684-691, 2003.

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

MÄDER, P. et al. Soil ecology: The impact of organic and conventional agriculture on soil biota and its significance for soil fertility. In: IFOAM, 11th.1996, Copenhagen. Proceedings of the International Scientific Conference. Tholey-Theley : IFOAM, 1996. vol.1, p.11-15,.

MARSH, T. L. et al. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p.3616-20, 2000.

MASSOL-DEYA, A. A. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: Akkermans, D. L. et. al. (Ed.) , **Molecular microbial ecology manual**. Dordrecht : Kluwer Academic, 1995. p.1-8.

MCCAIG, A. E.; 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.4, p. 1721-30, 1999.

MCCAIG, A. E.; GLOVER, A.; PROSSER J.I. Numerical analysis of a grassland bacterial community structure under different land management regimens by using ribosomal DNA sequence data denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.10, p. 4554-559, 2001.

MENDUM, T.A.; HIRSCH, P.R., Changes in the population structure of beta-group autotrophic ammonia oxidizing bacteria in arable soils in response to agricultural practice. **Soil Biology & Biochemistry**, Amsterdam, v.34, p.1479-85, 2002.

MEZEI, L.M.; STORTS, D.R. Purification of PCR products. In: GRIFFIN, H.G.; GRIFFIN, A.M. (Ed.). **PCR technology: Current Innovations**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.21.

NEWTON, C.R.; GRAHAM, A. **PCR**. Oxford: BIOS scientific, 1994. p.78-97.

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.

OGRAM, A. et al. Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. **Soil Biology & Biochemistry**, Amsterdam, v. 32, p. 1499-504, 2000.

OHTONEN, R.; AIKIO, S.; VÄRE, H. Ecological theories in soil biology. **Soil Biology Biochemistry**, Amsterdam, v. 29, p. 1613-19, 1997.

OLDEMAN, L.R. The Global extent of Soil Degradation, dans Greenland.In: D.J. et Szabolcs, I. (Ed.). **Soil Resilience and Sustainable Land Use**, Wallingford, RU, CAB-International, 1994 pp. 99-118.

PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, New York, v. 276, p. 734-40, 1997.

RANJARD, L.; RICHAUME, A. S. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v.152, p.707-16, 2001.

RANJARD, L.; et al. Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). **Microbial Ecology**, New York ,v.39, p.263-72, 2000.

REQUENA, N. et al. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 495-98, 2001.

RHEIMS, H.; SPRÖER, C.; RAINEY, F.A.; STACKEBRANDT, S. Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the Actinomyceteline of descent in different environments and geographical locations. **Microbiology**, New York, v. 142, p. 2863-70, 1996.

RITZ, K.; GRIFFITHS, B. S. Potential application of a community hybridization technique for assessing changes in the population structure of soil microbial communities. **Soil Biology Biochemistry**, Amsterdam, v. 963-71, 1994.

ROBLES, J.; DOERS, M. pGEM^R-T Vector Systems troubleshooting guide. **Promega Notes**, Madison, v.45, p.19, 1994.

ROBLETO, E. A.; BONERMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Effects of bacterial antibiotic production on rhizosphere microbial communities from a culture-independent

perspective. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.12, p. 5020-22, 1998.

RONDON, M.R.; GOODMAN, R.M.; HANDELSMAN, J. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.17, p.403-409, 1999.

RONDON, M.R. 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.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T.; Hrsg. (Ed.) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** 2th. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

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 reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.4, p.406-25, 1987.

SMALLA, K. et al. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.1220-25, 1998.

SANDAA, R.A. et al. Rapid methods for fluorometric quantification of DNA in soil. **Soil Biology Biochemistry**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 265-68, 1998.

SCHRAMM, A. et. al Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n°9, p.3480-85, 1998.

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 methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.2284-91, 2001

SORHEIM, R.; TORSVIK, V.L.; GOKOYR, J. Phenotypical divergences between populations of soil bacteria isolated on different media. **Microbiology Ecology**, New York, v. 17, p. 181-92, 1989.

STACKBRANDT E.; LIESACK W.; GOEBEL B.M.; Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 7, p.232-36, 1993

SUDHIR KUMAR, et al. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, **Bioinformatics**, Oxford, v.17, n.12, p.1244-45, 2001.

TABACCHIONI, S. et al. Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. **Microbiology Ecology**, New York, v. 40, p. 169-76, 2000.

THOMPSON, J.D. et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.24, p.4876-82, 1997.

TORSVIK V.; OVREAS L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.5, p.240-45, 2002.

TORSVIK, V.L. et al. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 776-81, 1990b.

TORSVIK, V.L. et al. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 782-87, 1990a.

TORSVIK, V.L. et al. Novel technics for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 64, p. 53-62, 1998.

VALARINI, P.J. et al. Physico-chemical and microbiological properties of soil as affected by irrigated agricultural systems. In: IFOAM International Scientific Conference 12. 1998, Mar del Plata. Proceedings of the International Scientific Conference Mar del Plata: 1998, p. 165-170.

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.

WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, London v.345, p.63-65, 1990.

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

WU, L. et al. Development and and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.5780-90, 2001.

YANG, Y. H. et al. Effects of agricultural chemicals on DNA sequencing diversity of soil microbial community: A study with RAPD marker. **Microbial Ecology**, New York, v.39, p. 72-79, 2000.

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

APÊNDICE

Tabela 4 – Resultados das comparações das seqüências parciais da região 16S rDNA, obtidas do solo sob cultivo, biblioteca G, com as seqüências depositadas no GenBank em 07/06/2002, utilizando o programa BLAST. Numeração para identificação da seqüência no filograma, nº de acesso da seqüência no “GenBank” (Geneid), nome da seqüência, frequência de clones individuais em números totais, obtidas através do banco de dados metagenômico e em porcentagem.

Nº	Geneid	Nome da seqüência	Número de clones	Frequência em %
1	AB034713.1	Uncultured compost bacterium 4-49 gene for 16S rRNA, partial sequence	1	1.16
2	AB043854.1	Bacillus sp. N6 gene for 16S rRNA	1	1.16
3	AB075095.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:KSS10	1	1.16
4	AB078049.1	Flexibacter filiformis gene for 16S rRNA, strain:IFO 15056	2	2.33
5	AB078068.1	Flexibacter sancti gene for 16S rRNA, strain:IFO 16034	1	1.16
6	AF105422.1	Cellulomonas pachnodae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
7	AF137508.1	Herbaspirillum rubrisubalbicans 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
8	AF141418.1	Uncultured Cytophagales 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
9	AF208505.1	Bradyrhizobium japonicum strain USDA 124 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete	1	1.16
10	AF234151.1	Uncultured bacterium #0319-7H2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
11	AF234707.1	Uncultured sludge bacterium A21b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
12	AF292996.1	Uncultured Green Bay ferromanganous micronodule bacterium MNF4 16S sequence	1	1.16
13	AF293006.1	Uncultured Green Bay ferromanganous micronodule bacterium MND1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3	3.49

14	AF314430.1	Uncultured bacterium PHOS-HE31 16S ribosomal RNA gene, partial ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
15	AF316798.1	Uncultured Crater Lake bacterium CL500-13 16S ribosomal RNA gene, sequence	1	1.16
16	AF329476.1	Bacillus sporothermodurans 16S ribosomal RNA gene, partial sequence partial sequence	2	2.33
17	AF345555.1	Rhizobium sp. X59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
18	AF358001.1	Uncultured bacterium clone LO13.1 16S ribosomal RNA gene, partial	1	1.16
19	AF391984.1	Uncultured thermal soil bacterium clone YNPFFP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence sequence	1	1.16
20	AF423204.1	Uncultured soil bacterium clone 10-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
21	AF423207.1	Uncultured soil bacterium clone 1035-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
22	AF423222.1	Uncultured soil bacterium clone 1326-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
23	AF423284.1	Uncultured soil bacterium clone 646-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
24	AF423297.1	Uncultured soil bacterium clone 889-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
25	AF428894.1	Uncultured bacterium clone CR98-35-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
26	AF431223.1	Uncultured beta proteobacterium clone N11.99WL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
27	AF431253.1	Uncultured beta proteobacterium clone N27.100SM 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2	2.33
28	AF431561.1	Uncultured CFB group bacterium clone N27.112SM 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
29	AF432679.1	Uncultured bacterium clone NMS8.79WL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16

30	AF445694.1	Uncultured beta proteobacterium clone SM1F12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
31	AF446321.1	Uncultured eubacterium FL13B05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
32	AF465676.1	Uncultured bacterium DGGE band YNPRH-B18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
33	AF498733.1	Bacterium Ellin351 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
34	AF502210.1	Uncultured bacterium clone HP1B19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
35	AF507408.1	Uncultured soil bacterium clone C0148 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2	2.33
36	AF507632.1	Uncultured soil bacterium clone C1170 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
37	AF507666.1	Uncultured soil bacterium clone C1151 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
38	AF507766.1	Uncultured soil bacterium clone S1154 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2	2.33
39	AF519464.1	Bacillus pichinotyi strai42n RS2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
40	AF519468.1	Bacillus senegalensis strain RS8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	4	4.65
41	AF523956.1	Uncultured bacterium clone FW2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
42	AF529343.1	Uncultured alpha proteobacterium clone CLi8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
43	AJ000983.1	Uncultured bacterium DA54134 16S rRNA gene	15	17.44
44	AJ001222.1	Uncultured bacterium D56A154 16S ribosomal RNA	2	2.33
45	AJ244307.1	uncultured bacterium Riz6D 5816S rRNA gene, partial	1	1.16
46	AJ250318.1	Bacterium LMG 18435 16S rRNA gene, strain LMG 18435	1	1.16
47	AJ252616.1	Agricultural soil bacterium clone SC-I-13, 16S rRNA gene (partial)	1	1.16
48	AJ252660.1	Agricultural soil bacterium clone SC-I-84,	1	1.16

		16S rRNA gene (partial)		
49	AJ292589.1	uncultured eubacterium WD292 partial 16S rRNA gene, clone WD292	1	1.16
50	AJ292603.1	uncultured eubacterium WD275 partial 16S rRNA gene, clone WD275	4	4.65
51	AJ306740.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SHA-2	2	2.33
52	AJ316313.1	Bacillus sp. LMG 20241 partial 16S rRNA gene, strain LMG 20241	1	1.16
53	AJ318168.1	Uncultured delta proteobacterium 16S rRNA gene, clone Blrii41	1	1.16
54	AJ345019.1	Paenibacillus sp. DSM 1482 partial 16S rRNA gene, strain DSM 1482	1	1.16
55	AJ532715.1	Uncultured delta proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone JG34-KF-369	3	3.49
56	AJ536441.1	unidentified bacteria partial 16S rRNA gene, isolate 7:5, 576BP	1	1.16
57	AY037677.1	Uncultured earthworm cast bacterium clone C020 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
58	AY039016.1	Bradyrhizobium sp. ORS 3260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	4	4.65
59	AY043085.1	Bacillus benzoovorans 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
60	AY043781.1	Uncultured beta proteobacterium clone NMW3.98WL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
61	AY043918.1	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone NMW3.15WL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
62	AY043942.1	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone SMS9.135WL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
63	AY100620.1	Uncultured bacterium clone cvf63078 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
64	AY135649.1	Xanthomonas axonopodis pv. allii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
65	AY138288.1	Bacillus thuringiensis strain 2000031494 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
66	AY141980.1	Rhizobium sp. SH445 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16

67	AY150908.1	Uncultured Rubrobacteridae bacterium clone WYO23C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
68	AY154536.1	Uncultured earthworm intestine bacterium clone lw07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2	2.33
69	AY172987.1	Bacillus sp. Kanghwensis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
70	D78311.1	Bacillus benzoovorans strain DSM5391 DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence	5	5.81
71	U42918.1	Unidentified soil organism R6-69 16S rRNA gene, partial sequence	1	1.16
72	U68639.1	Unidentified eubacterium from the Amazon 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
73	U68644.1	Unidentified eubacterium from the Amazon 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	1.16
74	X99966.1	Uncultured bacterium DA056, mark02 partial 16S rRNA gene	1	1.16
75	Y07578.1	Uncultured bacterium DA115 16S rRNA gene	1	1.16
76	Y07580.1	Uncultured bacterium DA011 16S rRNA gene	1	1.16
77	Y07584.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone DA026)	1	1.16
78	Z26315.1	Desulfotomaculum thermosapovorans ribosomal RNA	1	1.16
79	Z95710.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone 32-10)	9	10.47
80	Z95712.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone 32-19)	3	3.49
81	Z95714.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone 32-21)	2	2.33
82	Z95719.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone RB27)	2	2.33
83	Z95721.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone RB40)	1	1.16
84	Z95725.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone ii3-15)	4	4.65
85	Z95732.1	Bacterial species 16S rRNA gene (clone kb2426)	1	1.16
86	AY102909.1	Uncultured bacterium clone BCM3S-34B	1	1.16

		16S ribosomal RNA gene, sequence	partial		
--	--	-------------------------------------	---------	--	--

Tabela 5 – Resultados das comparações das seqüências parciais da região 16S rDNA obtidas do solo sob floresta, biblioteca LS, com as seqüências depositadas no GenBank em 07/06/2002, utilizando o programa BLAST. Numeração para identificação da seqüência no filograma, nº de acesso da seqüência no “GenBank” (Geneid), nome da seqüência, freqüência de clones individuais em números totais, obtidas através do banco de dados metagenômico e em porcentagem.

Nº	Geneid	Nome da seqüência	Número de clones	Freqüência em %
1	AB055990.1	Uncultured archaeon WSB-8 gene for 16S rRNA	1	0.83
2	AB064702.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: NK230	2	1.67
3	AB087342.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: F41	1	0.83
4	AF010015.1	Unidentified eubacterium 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
5	AF010096.1	Unidentified eubacterium 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
6	AF013522.1	Uncultivated soil bacterium clone C019 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
7	AF013565.1	Uncultivated soil bacterium clone S118 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
8	AF129522.1	AF129522 Legionella dumoffii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
9	AF145843.1	AF145843 Metal-contaminated soil clone K20-48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
10	AF145870.1	AF145870 Metal-contaminated soil clone K20-82 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
11	AF145879.1	AF145879 Metal-contaminated soil clone K20-95 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
12	AF165267.1	AF165267 Pasture soil clone HPS-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2	1.67
13	AF174436.1	AF174436 Saccharothrix aerocolonigenes strain NRRL B-16139 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83

14	AF186413.1	Uncultured sponge symbiont PAUC37f 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
15	AF200699.1	AF200699 Uncultured Acidobacterium UA3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	6	5.00
16	AF226234.1	Uncultured maize root bacterium Zmrc211 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
17	AF234131.1	AF234131 Uncultured bacterium #0319-6G20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
18	AF234132.1	AF234132 Uncultured bacterium #0319-6G9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
19	AF292996.1	AF292996 Uncultured Green Bay ferromanganous micronodule bacterium MNF4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
20	AF293007.1	AF293007 Uncultured Green Bay ferromanganous micronodule bacterium MNC9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
21	AF316785.1	AF316785 Uncultured Crater Lake bacterium CL500-26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
22	AF353297.1	AF353297 Uncultured bacterium Tui3-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
23	AF358002.1	Uncultured bacterium clone LO13.10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
24	AF382400.1	Anaeromyxobacter dehalogenans strain 2CP-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
25	AF388320.1	AF388320 Uncultured bacterium clone Ac67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
26	AF388362.1	AF388362 Uncultured bacterium clone Ac57 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
27	AF391981.1	AF391981 Uncultured thermal soil bacterium clone YNPFFP40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2	1.67

28	AF392742.1	AF392742 Uncultured bacterium clone LBD5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
29	AF403191.1	AF403191 Uncultured bacterium clone cvf122212 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
30	AF407700.1	Uncultured bacterium clone G13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
31	AF407708.1	Uncultured bacterium clone G58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
32	AF422588.1	Uncultured bacterium clone t013 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
33	AF423292.1	Uncultured soil bacterium clone 760-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
34	AF431203.1	Uncultured alpha proteobacterium clone S51.36PG 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
35	AF431409.1	Uncultured Acidobacterium group bacterium clone N11.137WL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2	1.67
36	AF431481.1	Uncultured Acidobacterium group bacterium clone C46.15PG 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	5	4.17
37	AF431508.1	Uncultured Acidobacterium group bacterium clone S51.16PG 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
38	AF431592.1	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone C31.18SM 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
39	AF431597.1	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone N41.100PG 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
40	AF432803.1	Uncultured bacterium clone S23.29WL 16S ribosomal RNA gene, partial	1	0.83
41	AF445095.1	Uncultured bacterium clone Tc25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
42	AF445143.1	Uncultured bacterium clone Tc84 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
43	AF465652.1	Uncultured gamma proteobacterium YNPRH65B 16S ribosomal RNA gene, sequence	1	0.83
44	AF465676.1	Uncultured bacterium DGGE band YNPRH-B18 16S ribosomal RNA gene,	2	1.67

		partial sequence		
45	AF498705.1	Bacterium Ellin323 16S ribosomal RNA gene, partial sequence partial sequenc	3	2.50
46	AF498714.1	Bacterium Ellin332 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2	1.67
47	AF498724.1	Bacterium Ellin342 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2	1.67
48	AF498753.1	Bacterium Ellin371 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
49	AF507438.1	Uncultured soil bacterium clone C071 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
50	AF507459.1	Uncultured soil bacterium clone C0100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
51	AF507687.1	Uncultured soil bacterium clone C129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
52	AF514703.1	Bradyrhizobium sp. Ai1a-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
53	AF523977.1	Uncultured bacterium clone FW116 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
54	AF523980.1	Uncultured bacterium clone FW14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
55	AF529322.1	Uncultured Acidobacterium group bacterium clone CLi114 16S ribosomal	1	0.83
56	AF545649.1	Uncultured candidate division BD bacterium clone BDfull1 16S RNA gene, partial sequence	1	0.83
57	AJ011327.1	PSP011327 Paenibacillus borealis 16S rRNA gene, isolate HM31 ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
58	AJ011423.1	UBA011423 unidentified bacterium 16S rRNA gene, partial, isolate B5	1	0.83
59	AJ224042.1	NSPAJ4042 Nitrospira sp. clone o9, 16S rRNA gene	1	0.83
60	AJ252622.1	ASO252622 Agricultural soil bacterium clone SC-I-19, 16S rRNA gene (partial)	2	1.67
61	AJ252644.1	ASO252644 Agricultural soil bacterium clone SC-I-60, 16S rRNA gene (partial)	1	0.83
62	AJ252653.1	ASO252653 Agricultural soil bacterium clone SC-I-74, 16S rRNA gene (partial)	1	0.83

63	AJ252684.1	RSO252684 Rhizosphere soil bacterium clone RSC-II-52, 16S rRNA gene (partial)	2	1.67
64	AJ289987.1	UBA289987 Uncultured bacterium FukuN104 partial 16S rRNA gene	1	0.83
65	AJ292580.1	UEU292580 uncultured eubacterium WD244 partial 16S rRNA gene, clone WD244	7	5.83
66	AJ292581.1	UEU292581 uncultured eubacterium WD247 partial 16S rRNA gene, clone WD247	1	0.83
67	AJ292582.1	UEU292582 uncultured eubacterium WD254 partial 16S rRNA gene, clone WD254	1	0.83
68	AJ292589.1	UEU292589 uncultured eubacterium WD292 partial 16S rRNA gene, clone WD292	2	1.67
69	AJ292603.1	UEU292603 uncultured eubacterium WD275 partial 16S rRNA gene, clone WD275	1	0.83
70	AJ292792.1	UEU292792 uncultured eubacterium WR856 partial 16S rRNA, clone WR856	2	1.67
71	AJ292844.1	UEU292844 uncultured eubacterium WR8100 partial 16S rRNA, clone WR8100	1	0.83
72	AJ306764.1	UBA306764 Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SHA-261	1	0.83
73	AJ318121.1	UBA318121 Uncultured Bacteroidetes bacterium 16S rRNA gene, clone Blfcii37	1	0.83
74	AJ347048.1	UBA347048 Uncultured bacterium 16S rRNA gene, clone TK67	1	0.83
75	AJ518785.1	UGA518785 Uncultured gamma proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone JG37-AG-87	1	0.83
76	AJ519378.1	UBA519378 Uncultured Holophaga sp. partial 16S rRNA gene, clone JG37-AG-67	2	1.67
77	AJ536874.1	UBA536874 Uncultured Holophaga sp. partial 16S rRNA gene, clone JG30a-KF-86	2	1.67
78	AJ536876.1	UBA536876 Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone JG30a-KF-32	7	5.83

79	AJ536877.1	UBA536877 Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone JG30a-KF-39	2	1.67
80	AY037576.1	Uncultured soil bacterium clone S041 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
81	AY037622.1	Uncultured soil bacterium clone S105 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
82	AY037727.1	Uncultured earthworm cast bacterium clone C123 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
83	AY037745.1	Uncultured earthworm cast bacterium clone C143 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
84	AY043922.1	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone NMW3.207WL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
85	AY043932.1	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone SMW4.8WL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
86	AY043933.1	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone NMS8.47WL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
87	AY043936.1	Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone NMS8.95WL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
88	AY043950.1	Uncultured CFB group bacterium clone SMW4.2WL 16S ribosomal RNA	1	0.83
89	AY064218.1	Anaerobranca californiensis strain Paoha-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
90	AY100535.1	Uncultured bacterium clone cvf70163 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3	2.50
91	AY102909.1	Uncultured bacterium clone BCM3S-34B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
92	AY154637.1	Uncultured earthworm cast bacterium clone c292 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
93	AY174199.1	Uncultured Acidobacteriales bacterium clone WS044 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83

94	AY174200.1	Uncultured Acidobacteriales bacterium clone WS100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
95	AY174204.1	Uncultured Acidobacteriales bacterium clone WS074 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
96	AY174209.1	Uncultured Acidobacteriales bacterium clone WS108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
97	U51864.1	UEU51864 Unidentified eubacterium EA25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3	2.50
98	U62853.1	UEU62853 Unidentified eubacterium RB35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
99	U68597.1	UEU68597 Unidentified eubacterium from the Amazon 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
100	U68612.1	UEU68612 Unidentified eubacterium from the Amazon 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
101	U68615.1	UEU68615 Unidentified eubacterium from the Amazon 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
102	U68644.1	UEU68644 Unidentified eubacterium from the Amazon 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3	2.50
103	U68652.1	UEU68652 Unidentified eubacterium from the Amazon 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
104	U68684.1	UEU68684 Unidentified eubacterium from the Amazon 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	0.83
105	X64380.1	BMC3116S Bacterium (soil clone MC31) 16S rDNA	6	5.00
106	X64381.1	BMC1716SD Bacterium (soil clone MC17) 16S rDNA	6	5.00
107	X68463.1	UAMC22 Unknown Actinomycete (MC 22) 16S rRNA	1	0.83
108	X68464.1	UAMC13 Unknown Actinomycete (MC 13) 16S rRNA	1	0.83
109	X68465.1	UAMC103 Unknown Actinomycete (MC 103) 16S rRNA	2	1.67
110	X68467.1	UAMC9 Unknown Actinomycete (MC 9)	2	1.67

		16S rRNA		
111	X82558.1	NMRRNA16S <i>N.moscoviensis</i> 16S rRNA gene	1	0.83
112	X90515.1	VSDNA16SR <i>V.spinosum</i> DNA for 16S ribosomal RNA gene	3	2.50
113	X97691.1	PM16SR <i>P.manganicum</i> 16S rDNA	1	0.83
114	Y12598.1	UE16SR122 Unidentified eubacterium 16S rRNA gene, clone DA122	1	0.83
115	Y17011.1	BCY17011 <i>Burkholderia caribiensis</i> 16S rRNA gene, strain MWAP84	1	0.83
116	Z95707.1	BSPZ95707 Bacterial species 16S rRNA gene (clone 11-14)	3	2.50
117	Z95710.1	BSPZ95710 Bacterial species 16S rRNA gene (clone 32-10)	2	1.67
118	Z95714.1	BSPZ95714 Bacterial species 16S rRNA gene (clone 32-21)	4	3.33
119	Z95723.1	BSPZ95723 Bacterial species 16S rRNA gene (clone RB43)	1	0.83
120	Z95730.1		1	0.83