



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
DIVERSIDADE BIOLÓGICA - PPG-DB**

**Diversidade microbiana dos solos de Terra Preta de Índio
e de Terra Mulata da Amazônia Ocidental.**

Luciana Batista da Silva

MANAUS

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
DIVERSIDADE BIOLÓGICA**

LUCIANA BATISTA DA SILVA

**Diversidade microbiana dos solos de Terra Preta de
Índio e de Terra Mulata da Amazônia Ocidental.**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
graduação em Diversidade Biológica,
Universidade Federal do Amazonas, como
requisito para a obtenção do título de
Mestre em Diversidade Biológica, Área de
Concentração: Caracterização da Biota da
Amazônia.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciana Leomil

Co-orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Financiamento: CT-AMAZONIA/MCT/CNPq

MANAUS

2009

Ficha Catalografica

Dados internacionais de catalogação na Publicação (CIP)

Batista-Silva, Luciana

Diversidade microbiana dos solos de Terra Preta de Índio e de Terra Mulata da Amazônia Ocidental. Luciana Batista da Silva. – Manaus, 2009.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amazonas, 2009.

Bibliografia.

1. Ecologia Microbiana 2. Microbiologia do solo 3. rRNA 4. Sequenciamento genético I. Título .

“Nada em Biologia faz sentido a não ser à luz da Evolução”

Dobzhansky (1973)

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais Ivan e Kátia, Irmãos Ivan Filho e Raphael,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço á Deus por seu imenso amor e misericórdia, que segurou a minha mão e me fez ter fé e não desistir nos momentos difíceis;

Á Meus pais Ivan e Kátia, por acreditarem em meus sonhos e me apoiarem em todas as fases desta jornada;

Aos Meus irmãos queridos Ivan Filho e Raphael pelo apoio e palavras de incentivos que me fizeram acreditar que sou capaz de realizar meus sonhos;

Ao meu namorado Mário Jr por seu imenso amor, que vem sendo demonstrado a cada dia, e por estar ao meu lado nesta conquista;

Á minha orientadora Dra Luciana Leomil, por sua dedicação e paciência em todos os momentos de minha jornada acadêmica, desde minha graduação, até este momento de realização profissional;

Ao prof Dr Spartaco Astolfi Filho que abriu as portas de seu laboratório, onde pude realizar toda a parte prática da minha dissertação;

Á profa MSc Grace, por me dar apoio e ouvidos em todos os momentos, e que sem saber, me fez amar a Ecologia;

As minhas amigas Fabíola e Gisele, por estarem sempre ao meu lado, em todos os momentos, sejam eles tristes ou alegres, que enxugaram minhas lágrimas, que me fizeram rir, que me apoiaram quando quis desistir de tudo. Muito obrigada mesmo.

As amigas Belle, Ciça, Mirna (cobrita) e Carolzinha, que me acompanham desde da graduação, onde vivenciamos experiências incríveis, e hoje por partilharem desse momento tão emocionante;

A Juliana, que me ajudou em algumas partes desta dissertação, e pelas tardes de conversas e apertos no Laboratório de DNA;

Aos amigos Bioinformatas Mário Nunes e Lívio que me socorrem e ajudam a desvendar mistérios dos programas de análises estatísticas. E por me ajudar altas horas da matina a fazer uma misera árvore filogenética (rs rs rs).

A minha família querida, tios e tias, avô, primas e primos, pelo apoio e em especial as minhas avós Ednilce e Nelly que estão no céu olhando por mim;

Á Dina e Jonso, por me ajudarem na fase de sequenciamento de DNA, sem vocês, não estaria aqui.

Lista de Figuras

Introdução

Figura 1 - Perfil do solo de Terra Preta de Índio mostrando os fragmentos de cerâmica e artefatos líticos (indicado pela seta vermelha), e sua profundidade denominada Horizonte A1, Horizonte A2, Horizonte AB, Horizonte BA e Horizonte B **22**

Figura 2 - Perfil do Solo de Terra Mulata, indicando o Horizonte A, com uma maior quantidade de matéria orgânica, e os outros horizontes com maior presença de latossolo **28**

Figura 3 - Mapa de substituição de nucleotídeos do 16s rRNA proposto por Van der Peer *et al.* (1996): nucleotídeos estão divididos em grupos de variabilidade crescente sendo as bases em vermelho as mais variáveis, e as em preto as menos variáveis. Posições absolutamente conservadas são apresentadas em roxo. Molécula apresentada no sentido 5' (seta amarela) → 3' (seta roxa). **38**

Capítulo 1

Figura 01 - Árvore Filogenética do Domínio Bacteria proposta por Hungenholtz *et al.* (1998b): a árvore apresenta 36 Filos bacterianos. Setas preenchidas indicam filios com representantes cultivados; e setas não preenchidas indicam filios compostos por indivíduos não-cultivados. A barra de escala representa 0,1 mudança nucleotídica por posição **57**

Figura 02 - Árvore Filogenética do Domínio Bacteria proposta por Raapé e Giovannoni (2003): árvore apresenta 52 filios bacterianos. Setas preenchidas representam os 12 filios originais (bactérias Gram-negativas foram divididas em Firmicutes e Actinobacteria, descritos por Woese, 1987); não preenchidas, os filios que possuem representantes cultivados reconhecidos desde 1987; e em cinza estão os 26 filios candidatos que não possuem representantes cultiváveis conhecidos. A barra de escala representa 0,05 mudanças nucleotídicas por posição. **58**

Figura 03 - Perfil eletroforético da amplificação do gene 16S rRNA para o Domínio Archea em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etídeo. 1) Padrão Molecular 1 kb Plus DNA (Invitrogen); 2) Controle positivo (amostra padrão); 3) Controle negativo; 4) Amostra de solo TP2 10 cm; 5) Amostra de solo TP2 20 cm; 6) Amostra de solo TP2 30 cm. **72**

Figura 04 - Perfil eletroforético da amplificação do gene 16S rRNA para o Domínio Bacteria em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etídeo. 1) Padrão Molecular 1 kb Plus DNA (Invitrogen); 2) Controle positivo (amostra padrão); 3) Controle negativo; 4) Amostra de solo TP2 10 cm; 5) Amostra de solo TP2 20 cm; 6) Amostra de solo TP2 30 cm. **72**

Figura 05 - Diversidade bacteriana encontrada nos clones 16s rRNA do solo TPI com base nos dados obtidos pela comparação nos bancos de dados do NCBI e RDP II **76**

- Figura 06** - Diversidade bacteriana encontrada nos clones 16s rRNA no solo TM (ou TA) com base nos dados obtidos pela comparação nos bancos de dados do NCBI e RDP II 77
- Figura 07** - Curva de rarefação gerada do gene 16S rRNA da biblioteca TPBact 88
- Figura 08** - Curva de rarefação gerada do gene 16S rRNA da biblioteca TPArch 88
- Figura 09** - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes ao Filo *Aquificales*, *Sphigobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Gammaproteobacteria* obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') so solo de Terra Preta de Índio. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritimo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 replicas. 93
- Figura 10** - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes ao Filo *Aquificales*, *Alphaproteobacteria*, *Sphigobacteria*, *Cloroflexi*, *Firmicutes*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') so solo de Terra Preta de Índio. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritimo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 replicas. 94
- Figura 11** - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Gammaproteobacteria*, *Proteobacteria*, *Sphigobacteria*. obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') so solo de Terra Preta de Índio. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritimo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 replicas. 95
- Figura 12** - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Acidobacteria*, *Nitrospira*, *Verrucomicrobia*. Obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') so solo de Terra Preta de Índio. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritimo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 replicas. 96
- Figura 13** - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Cloroflexi*, *Acidobacteria*, *Nitrospira*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Deltaproteobacteria* Obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') so solo de Terra Preta de Índio. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritimo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 replicas. Com grupo externo do Domínio Archaea. 97
- Figura 14** - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Betaproteobacteria*, *Proteobacteria*, *Sphigobacteria* e *Firmicutes*. obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') so solo de Terra Mulata. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritimo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 replicas. 98
- Figura 15** - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Proteobacteria*, *Proteobacteria*, *Sphigobacteria* e *Aquificales*. obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') so solo de Terra Mulata. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritimo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 replicas. 99

- Figura 16** - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Gammaproteobacteria*, *Cloroflexi*. Obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Mulata. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritimo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 replicas. 100
- Figura 17** - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Proteobacteria*, *Sphigobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Aquificales*, *Alphaproteobacteria*. Obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Mulata. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritimo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 replicas. 101
- Figura 18** - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Proteobacteria*, *Sphigobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Aquificales*. Obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Mulata. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritimo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 replicas. 102
- Figura 19** - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Proteobacteria*, *Sphigobacteria*, *Gammaptoteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Aquificales*. Obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Mulata. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritimo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 replicas. 103

Capitulo 2

- Figura 01** - Árvore filogenética do Domínio Archaea, dividida em 3 Filos: Euryarchaeota, Crenarchaeota e Korarchaeota. Este último ainda não possui representantes isolados, apenas seqüências genéticas do gene 16S rRNA (adaptado de Madigan *et al.*, 2003 - Brock Biology of Microorganisms) 113
- Figura 02** - Perfil eletroforético da amplificação do gene 16S rRNA para o Domínio Archea em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etídeo. 1) Padrão Molecular 1 kb Plus DNA (Invitrogen); 2) Controle positivo (amostra padrão); 3) Controle negativo; 4) Amostra de solo TP2 10 cm; 5) Amostra de solo TP2 20 cm; 6) Amostra de solo TP2 30 cm 127
- Figura 03** - Perfil eletroforético da amplificação do gene 16S rRNA para o Domínio *Archaea* em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etídeo; 1) Padrão Molecular 1 kb Plus DNA (Invitrogen); 2) Controle Positivo (amostra padrão); 3) Controle negativo; 4) Amostra de soloADJ 10 cm; 5) Amostra de solo ADJ20 cm; 6) Amostra de solo ADJ 30 cm 128
- Figura 04** - Diversidade da *Archaea* dos clones 16s rRNA encontrados no solo TPI com base nos dados obtidos pela comparação nos bancos de dados do NCBI e RDP II 131
- Figura 05** - Diversidade da *Archaea* dos clones 16s rRNA encontrados no solo TM com base nos dados obtidos pela comparação nos bancos de dados do NCBI e RDP II. 132
- Figura 06** - Curva de rarefação gerada do gene 16S rRNA da biblioteca TPArch. 139

- Figura 07** - Curva de rarefação gerada do gene 16S rRNA da biblioteca TAArch. 149
- Figura 08** - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Crenarchaeota*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Preta. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 réplicas 144
- Figura 09** - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Preta. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 réplicas 145
- Figura 10** - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Preta. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 réplicas 146
- Figura 11** - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Preta, com o grupo externo pertencente ao Domínio Bacteria. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 réplicas.com grupo externo. 147
- Figura 12** - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencente ao Filo. *Crenarchaeota*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Mulata. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 réplicas 148
- Figura 13** - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Mulata. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 réplicas 149
- Figura 14** - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Mulata, com o grupo externo do Domínio Bacteria. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 réplicas. Com grupo externo. 150

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1 - Resultado das análises químicas das amostras de TPI e TM, realizadas na Laboratório do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) na Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba (SP).	69
Tabela 2 - Resultados das análises físicas encontrados nas amostras de TPI e TM, pela técnica de granulometria	70
Tabela 3 - Quantificação de DNA de cada amostra utilizada nesta pesquisa pela leitura do espectrofotômetro	70
Tabela 4 - Número total de clones seqüenciados e clones obtidos pertencentes às bibliotecas: TPBact e TABact	74
Tabela 5 - Estimativas de riquezas de OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) e índices de diversidade calculados a partir da bibliotecas de 16S rRNA do Domínios Bacteria dos solos de Terra Preta de Índio e Terra Mulata	89

Capítulo 2

Tabela 1 - Resultado das análises químicas das amostras de TPI e TM, realizadas no Laboratório do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) na Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba (SP)	125
Tabela 2 - Resultados das análises físicas encontrados nas amostras de TPI e TM, pela técnica de granulometria	125
Tabela 3 - Quantificação de DNA de cada amostra utilizada nesta pesquisa pela leitura do espectrofotômetro	126
Tabela 4 - Número total de clones seqüenciados e clones obtidos pertencentes às bibliotecas: TPArch e TAArch	132
Tabela 5 - Estimativas de riquezas de OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) e índices de diversidade calculados a partir da bibliotecas de 16S rRNA dos Domínios Archaea dos solos de Terra Preta de Índio e Terra Mulata.	140

SUMÁRIO

Amplificação do gene 16S rRNA pela PCR.....	61
1. INTRODUÇÃO.....	19
Clonagem do gene 16S rRNA.....	62
1.1. Solos de Terra Firme.....	19
Purificação dos Produtos de PCR	62
1.2. Solo de Terra Preta Antropogênica (TPA) ou Terra Preta de Índio (TPA).....	21
Sistema de Ligação	63
1.3. Solo de Terra Mulata (TM).....	27
Transformação.....	63
1.4. Diversidade Microbiana do Solo.....	28
Seqüenciamento do Gene 16S rRNA	65
1.5. A utilização de DNA em estudos moleculares da biodiversidade....	34
Processamento e Análise das Seqüências	66
1.6. Biblioteca 16S rRNA de solos amazônicos.....	39
Análises Filogenéticas e Estatísticas.....	66
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
3. OBJETIVOS.....	53
Coleta e caracterização dos solos.....	67
3.1. Objetivo Geral.....	53
Extração de DNA genômico total do solo.....	70
3.2 Objetivos específicos.....	53
Amplificação e purificação do gene 16S rRNA.....	54
Diversidade Bacteriana do Solo de Terra Preta de Índio e Terra Mulata da Amazônia Ocidental.....	54
Construção das Bibliotecas 16S rRNA.....	73
INTRODUÇÃO.....	54
Seqüenciamento parcial dos clones e Análise das seqüências.....	59
MATERIAL E MÉTODOS.....	74
Análise de diversidade das comunidades bacterianas.....	59
Área de Estudo.....	77
Filo <i>Acidobacteria</i>	77
Coleta e Preparo das Amostras de Solo.....	59
Filo <i>Proteobacteria</i>	79
Análise do material para avaliar teores de macro e micro nutrientes....	60
Filo <i>Firmicutes</i>	82
Analises Físicas do Solo – Granulometria.....	60
Filo <i>Nitrospira</i>	83
Extração e Quantificação de DNA genômico de solo.....	61
Filo <i>Verrucomicrobia</i>	84

Coleta e Preparação dos solos.....	123
Extração de DNA genômico total do solo.....	125
Filo <i>Cloroflexi</i>	128
Amplificação e purificação do gene 16S rRNA.....	
Filo <i>Planctomycetes</i> 16S rRNA.....	86
Estimativa de riqueza e índice de diversidade.....	129
Sequenciamento parcial dos clones e Análise das seqüências.....	
Análises Filogenéticas.....	90
CONCLUSÕES	194
Análise de diversidade do Domínio <i>Archaea</i>	194
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	194
<i>Archaea</i> Halófilas Extremas.....	194
CAPÍTULO 2	133
<i>Archaea</i> Metanogênicas.....	133
Diversidade do Domínio <i>Archaea</i> do solo de Terra Preta de Índio e Terra Mulata da Amazônia Ocidental.....	137
<i>Archaea</i> Hipertermófilas.....	137
INTRODUÇÃO	138
Estimativa de riqueza e índice de diversidade.....	145
MATERIAL E MÉTODOS	145
Análises Filogenéticas.....	145
Área de Estudo.....	145
CONCLUSÕES	145
Coleta e Preparo das Amostras de Solo.....	156
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163
Análise do material para avaliar teores de macro e micro nutrientes...	163
CONCLUSÃO GERAL	164
Análises Físicas do Solo – Granulometria.....	164
ANEXOS	118
Extração e Quantificação de DNA genômico de solo.....	118
Amplificação do gene 16S rRNA pela PCR.....	118
Clonagem do gene 16S rRNA.....	119
Purificação dos Produtos de PCR	119
Sistema de Ligação	119
Transformação.....	120
Seqüenciamento do Gene 16S rRNA	121
Processamento e Análise das Seqüências	122
RESULTADOS E DISCUSSÃO	123

Diversidade microbiana dos solos de Terra Preta de Índio e de Terra Mulata da Amazônia Ocidental

Resumo

A Amazônia caracteriza-se por apresentar dois ecossistemas principais, os inundáveis e os não-inundáveis, sendo que este engloba a terra firme onde encontra-se os sítios arqueológicos antropogênicos originados pela ação humana de povos pré-colombianos da Amazônia. Este solo é rico em matéria orgânica e com alto teor de nutrientes, o que proporciona um habitat favorável a comunidade microbiana, podendo ou não demonstrar uma imensa diversidade microbiana em ambientes naturais que ainda encontra-se por ser desvendada, e a utilização de seqüências do gene 16S rRNA diretamente nestes ambientes tem tornado possível estimar essa diversidade. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi construir quatro bibliotecas 16S rRNA de solos de Terra Preta de Índio (TPBact e TPArch) e Adjacente (TABact e TAArch), visando comparar a biodiversidade do Domínio Bacteria e do Domínio Archaea entre estes dois tipos de solos. Foram selecionados 960 clones para o Domínio Bacteria e 672 clones para o Domínio Archaea e foram comparados usando os bancos de dados do NCBI (BLAST) e RDP-II. Os resultados mostraram o predomínio de microrganismos desconhecidos e ou não-cultivados representando 38% em TPBact, 58% em TABact, 52% em TPArch e 49% em TAArch. Os Filos encontrados para as bibliotecas do Domínio Bacteria foram: *Acidobacteria* (20% em TPBact e 11% TABact); *Nitrospira* (8% TPBact e 1%

em TABact); *Firmicutes* (7% TPBact e 3% TABact); *Actinobacteria* e *Alphaproteobacteria* (5% TPBact e 4% TABact); *Proteobacteria* (5% TPBact e 2% TABact); *Sphigobacteria* (2% TPBact e 5% TABact) e por fim, 4% de *Gammaproteobacteria* em ambas as bibliotecas. Para o Domínio *Archaea* foram encontrados apenas dois Filos, *Crenarcheota* (40% TPArch e 46% TAArch) e *Euryarcheota* (8% TPArch e 5% TAArch). De um modo geral, os valores obtidos pelos índices de Simpson e Shannon para a biblioteca do Domínio Bacteria de Terra Preta e Mulata, nos mostraram uma maior diversidade netes solos, enquanto isso não ocorre para as bibliotecas de *Archaea*, talvez porque estas últimas sejam pouco descritas na literatura. Este trabalho visou contribuir com o conhecimento sobre a diversidade do Domínio Bacteria, com sua grande diversidade de Filos, e do Domínio *Archaea*, um grupo que ainda precisa ser mais estudado, principalmente nos solos amazônicos, com sua importância ecológica e biotecnológica.

Palavras chaves: Terra Preta de Índio, Terra Mulata, Domínio Bactéria, Domínio *Archaea*, 16S rRNA

Microbial diversity of soils of the Dark Earths and soil Mulata the Western Amazon.

Abstract

The Amazon is characterized primarily by having two major ecosystems, the flooding and no flooding, which is covering the land where it is anthropogenic archaeological sites caused by human action from pre-Columbian peoples of Amazon, rich in organic matter with high nutrient content, which provides a favorable habitat for microbial community can or can't shows vast diversity of microbial populations in natural environments and until this moment was not disclosure and make use of sequences of 16S rRNA gene directly from the environment has be possible to estimate this diversity. Facing this, the objective of this study was to construct four libraries 16S rRNA from soils Anthropogenic Dark Earth (TPBact e TPArch) and adjacente soil (TABact e TAArch), to compare biodiversity of Bacteria Domain and Archaea Domain between these two environments. Were selected 960 clones to Bacteria Domain and 672 clones to Archaea Domain and were compared using databases of Genbank (NCI-USA) and RDP-II program. Data analyses indicated prodominance of microoganims unknown from 38% among the sequences from TPBact, 58% from TABact, and 52% from TPArch and 49% from TAArch. The phylum founded for libraries to Domain Bacteria was: *Acidobacteria* (20% TPBact and

11% TABact); *Nitrospira* (8% TPBact and 1% TABact); *Firmicutes* (7% TPBact and 3% TABact); *Actinobacteria* and *Alphaproteobacteria* (5% TPBact and 4% TABact); *Proteobacteria* (5% TPBact and 2% TABact); *Sphigobacteria* (2% TPBact and 5% TABact) and 4% *Gammaproteobacteria* in both libraries. For Archaea Domain were found just two phylum, *Crenarcheota* (40% TPArch and 46% TAArch) e *Euryarcheota* (8% TPArch and 5% TAArch). Overall values obtained from Simpson and Shannon indexes for library Bacteria Domain of Dark Earth and Mulata showed greater diversity in this soil, while it doesn't occur to Archaea libraries, perhaps because they are poorly described in literature. This study aimed to contribute with knowledge about variety of Bacteria Domain, with great diversity of Filos and Archaea Domain, a group still needs to be further studied, mainly in Amazonian soil, with its ecological significance and biotechnological

Keys-words: Dark Earth, Mulata soil , Domain Bactéria, Domain Archaea, 16S rRNA

1. Introdução

1.1. Solos de Terra Firme

A extensão total aproximada da Floresta Amazônica é de 5,5 milhões de km², e a área da bacia hidrográfica amazônica com sete milhões de km² (incluindo a bacia dos rios Araguaia e Tocantins). Este ecossistema distribui-se mais ou menos da seguinte forma, dentro e fora do território nacional: 60% no Brasil e o restante pela Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela.

A Floresta Amazônica é auto-sustentável, pois possui diferentes mecanismos de manutenção para a obtenção de nutrientes necessários para seu desenvolvimento (FRANKEN *et al.*, 1985). A camada superficial da floresta pode

exibir considerável heterogeneidade espacial e temporal na distribuição de populações microbianas (THIES e SUZUKI, 2003).

Na floresta de terra firme da Amazônia Central, a maior produção de liteira fina se dá no período menos chuvoso, de junho a outubro, enquanto que a maior parte da decomposição ocorre durante a estação chuvosa (LUIZÃO e SCHUBART, 1987). As folhas, que representam 70% do total da liteira, são de rápida decomposição. A liteira fina produzida cada ano (8,25 t/ha), proporciona uma entrada de 3.880 kg de carbono, 151 kg de nitrogênio, 3 kg de fósforo, 16 kg de enxofre, 15 kg de potássio, 37 kg de cálcio, 14 kg de magnésio e 9 kg de sódio, para o solo de uma floresta de platô sobre Latossolo Amarelo (LUIZÃO, 1989). Além desses elementos químicos, geralmente considerados como nutrientes para as plantas, a floresta cicla uma quantidade significativa de outros elementos da liteira, nutrientes ou não, principalmente de silício e de alumínio, mostrando, então, uma forte relação entre a atividade biológica e a composição mineral dos solos da floresta de terra firme (LUCAS *et al.*, 1993).

O solo de terra firme sob floresta primária, devido à sua pobreza em nutrientes, bem como sua baixa capacidade de troca catiônica, atua apenas promovendo uma resistência a lixiviação dos nutrientes, suficiente para que os mesmos sejam eficientemente assimilados pela vegetação. No solo, a fração líquida é denominada de solução do solo, e existe uma constante e complexa interação entre ela e a fração sólida (reservatório de íons); e quando a planta retira íons da solução do solo, sua concentração pode variar com o tempo de maneira diferente para cada nutriente e para cada condição ambiental especial, e por isso, a sua determinação é difícil e apenas valores médios aproximados podem ser obtidos (REICHARDT, 1996).

Nos ecossistemas amazônicos, durante a época seca, os microrganismos (principalmente fungos e bactérias) atuam em grande número na liteira em decomposição, a fim de garantir a incorporação dos elementos minerais no perfil do solo. Rizóbios, fungos micorrízicos e solubilizadores de fosfato são outros microrganismos do solo que têm indicado sua importância nos ecossistemas de terra firme, inclusive com aumentos significativos no desenvolvimento das plantas (FARIAS e OLIVEIRA, 1994). A fertilidade natural da maioria dos solos amazônicos diminui de forma acentuada quando é retirada sua cobertura vegetal (PEREIRA *et al.*, 2000). Considerando que a ciclagem de nutrientes, praticamente fechada, assegura a manutenção da floresta de terra firme, a remoção das árvores e a substituição de floresta por pastagens ou outras atividades agrícolas leva à diminuição de nutrientes do compartimento biomassa, transferindo-os temporariamente ao solo (FERREIRA *et al.*, 2006).

1.2. Solo de Terra Preta Antropogênica (TPA) ou Terra Preta de Índio (TPI)

A Amazônia possui solos, em sua grande maioria, denominados de Latossolos amarelos e Argissolos, que são considerados solos escassos em nutrientes, com elevada acidez e com uma capacidade de troca catiônica baixa (SANTOS, 1987), tendo então, seu uso limitado na produção agrícola de um modo geral, além disso, representam 74,4% dos solos da região.

Entretanto, na Região Amazônica, são encontradas manchas de solo de cor escura e altamente fértil, denominadas de Solo de Terra Preta Antropogênica (TPA) ou Terra Preta de Índio (TPI), podendo cobrir pelo menos 0,3% da Floresta Amazônica (SAMBROEK *et al.*, 2003). As áreas, onde comumente a TPA é encontrada, são compostas de latossolo, podizóis, podizólicos e terra roxa

estruturada (SMITH, 1980), e normalmente se localizam em terra firme, próximas às margens de rios, em locais bem drenados.

As TPAs estão amplamente distribuídas em vários países da América Latina, como Colômbia, Peru, Venezuela, Guianas (KERN *et al.*, 2003), e ocorrem manchas isoladas e de diferentes dimensões em toda a Região Amazônica (FALESI *et al.*, 1997), ocupando áreas que podem chegar até 3 hectares, mas já houve indícios de sítios que mediam mais de 100 hectares, localizado na Estação Científica Ferreira Pena - Floresta Nacional de Caxiuanã, no Estado do Pará. Mas apesar de todos esses indícios de sítios arqueológicos, ainda não se tem um mapeamento correto da localização da TPA em toda a extensão da região (SMITH, 1980).

A Terra Preta de Índio (TPI) tem essa denominação porque é encontrada em sítios arqueológicos, onde viveram grupos pré-históricos (KERN e COSTA, 1997). Por isso, há grande quantidade de material deixado por esses grupos indígenas, como fragmentos cerâmicos, carvão e artefatos líticos (de pedra) distribuídos na matriz dos horizontes superficiais do solo (Figura 1) (FALEZI, 2001). Normalmente, o material arqueológico é bem diversificado, o que leva a crer que grupos culturais distintos habitaram um mesmo local.

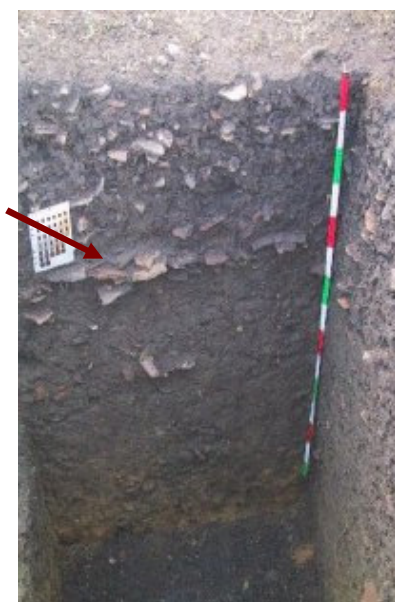


Figura 1 - Perfil do solo de Terra Preta de Índio mostrando os fragmentos de cerâmica e artefatos líticos (indicado pela seta vermelha).

A TPI pode ser identificada por sua cor escura, resultado da concentração de substâncias orgânicas depositadas no solo que apresentam altos teores de cálcio, carbono, magnésio, manganês, fósforo e zinco, elementos que tornam a terra fértil (SOMBROEK, 1966; KERN e KAEMPF, 1989; KERN, 1997). Este solo apresenta o pH em torno de 5 e uma grande quantidade de matéria orgânica, que pode chegar a ser 6 vezes maior em relação aos solos adjacentes (GLASER *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2002), e possui baixa saturação de alumínio e ferro (KERN e KAEMPF, 1989).

Normalmente, possui até 60 cm de espessura vertical (Figura 1), mas podendo chegar até 2 metros de profundidade (SMITH, 1980). É denominado da seguinte forma: Horizonte A1, Horizonte A2, Horizonte AB, Horizonte BA e Horizonte B, sendo as camadas A e AB mais férteis e antropizadas. Não existem diferenças na fertilidade da TPA em relação à superfície de solos sob cultivo agrícola, aparentemente, este solo forma ecossistemas próprios e quase inesgotáveis, mesmo sob condições adversas, como o clima, lixiviação, entre outros (PABST, 1991; GLASER *et al.*, 2001). Por estas razões, os mesmos são amplamente utilizados por pequenos agricultores de mandioca, banana, milho, pois há menos gastos com insumos e fertilizantes, e continuam obtendo uma alta produtividade (SMITH, 2000).

Os solos executam várias funções que, direta ou indiretamente, sustentam a população humana do mundo. Eles possuem uma importância vital na produção de alimentos e como reservatórios de água. No aspecto global, os solos atuam,

por exemplo, estocando grande parte do carbono do planeta (duas vezes mais o que existe na atmosfera), tamponando e filtrando grande parte dos poluentes, e também como os principais mediadores dos ciclos biogeoquímicos (O'DONNELL e GÖRRES, 1999).

A estrutura do solo depende da associação entre as partículas minerais (areia, silte, argila) e matéria orgânica, no qual agregados de diferentes tamanhos e estabilidade são formados. A organização estrutural das partículas do solo produz um habitat espacialmente heterogêneo para os microrganismos caracterizados por diferentes substratos, nutrientes, concentração de oxigênio, conteúdo de água e valores de pH (LADD *et al.*, 1996). O estado agregado do solo cria poros na matriz permitindo a existência de ar e água essenciais às suas funções biológicas. Sessistsch *et al.* (2001) demonstraram que não apenas a biomassa, mas também a estrutura da comunidade é significativamente afetada pelo tamanho da partícula do solo e que as frações de argila (0,1 - 2 μm) e de silte (2 - 63 μm) possuem a maior diversidade microbiana. Essa estrutura também determina, por exemplo, com que facilidade as plantas poderão extrair água e a taxa de difusão de compostos para dentro e para fora da matriz (YOUNG e CRAWFORD, 2004).

As TPIs formam microecossistemas próprios, que não se esgotam rapidamente, mesmo em condições tropicais em que estão expostas ou sob uso agrícola. A elevada fertilidade, e principalmente, a sustentabilidade desses solos são devido à elevado índice de matéria orgânica, bem como, de suas peculiares propriedades físico-químicas. Uma proporção significativa do carbono orgânico nas TPIs, aproximadamente 45%, está sob forma de carvão pirogênico (GLASER *et al.*, 2000), que é altamente resistente à oxidação termal e química (WOLBACH,

1989; SKJEMSTAD *et al.*, 1996). Mesmo que esse carbono sofra degradação natural (BIRD *et al.*, 1999), a sua incorporação no solo se torna de suma importância para o seqüestro de carbono, sendo um dos fatores que propiciam maior fertilidade (NOACK, 2000).

Existem várias hipóteses sobre a formação da TPA, uma das mais conhecidas seria as de eventos geológicos, como as cinzas de origem vulcânicas, a decomposição de rochas vulcanizadas ou a partir de sedimentos depositados nos fundos de lagos já extintos (FALESI, 1972). Outra hipótese refere-se à formação da incorporação intencional de nutrientes ao solo através de práticas de manejo, como queimadas. A proposição mais aceita é que teriam sido formadas pelo homem pré-histórico, entretanto, de forma não intencional (WOODS; MacCANN, 2001).

A existência de Terra Preta em grande quantidade na Bacia Amazônica fornece forte evidência de que as populações indígenas eram numerosas e assentadas, particularmente ao longo dos rios (SMITH, 1980). Nesses locais, acumulavam-se resíduos de origem vegetal (folhas, cascas sementes, entre outros) e de origem animal (ossos, sangue, gordura, fezes, carapaças, conchas, entre outros), além de uma grande quantidade de cinzas e resíduos de fogueiras (carvão vegetal). Como resultado dos resíduos orgânicos acumulados nesses assentamentos, formou-se um material orgânico estável em microecossistemas próprios, que ainda hoje se auto-sustentam e não conseguem se decompor, por isso não se exaurem facilmente (DENEVAN, 1976; SMITH, 1998; LEHMANN, 2002).

Nem todas as bactérias encontradas no solo são legitimamente telúricas, ou seja, residentes naturais do solo. Existem também aquelas classificadas

ecologicamente como residentes facultativas, pois são dependentes de substratos específicos presentes em determinados solos. Essas bactérias entram e proliferam-se no solo junto com excrementos, detritos vegetais e até mesmo cadáveres de animais (DROZDOWICZ, 1997).

Os microrganismos do solo são de importância fundamental para a manutenção da fertilidade do solo (O'NEILL *et al.*, 2006) e a presença de matéria orgânica estável propicia uma intensa atividade microbiana, e isto indica que a TPA pode ser uma fonte de germoplasma microbiano (TSAI *et al.*, 2003).

Ainda são escassas as informações sobre a diversidade microbiana, bem como estudos sobre a função específica desses organismos no solo e a contribuição desta biodiversidade para a manutenção da fertilidade sustentável, pois a maioria dos estudos voltados para a TPA é de aspecto geológico e antropológico. Faltam ainda estudos e pesquisas mais específicas para desvendar a diversidade de bactérias, arqueias e fungos presentes nesse solo, e suas respectivas funções pra manter a estrutura do mesmo.

Os resultados do presente trabalho visaram contribuir com o conhecimento sobre a diversidade bacteriana em Solo de Terra Preta de Índio e Terra Mulata, para a compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas no solo e o conhecimento de suas interações com outros componentes da biodiversidade, além de benefícios econômicos e estratégicos, como a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis em processos biotecnológicos.

1.3. Solo de Terra Mulata (TM)

Geralmente, os solos de Terra Preta são circundados por uma larga faixa de solos denominados de Terra Mulata (TM) e conhecidos como solos “transicionais”, pois estão localizados entre a propriedade da aldeia dos sítios de TPA e os solos inalterados da floresta. As TMs foram descritas por Sombroek (1996) em Belterra, na Região de Santarém, no Estado do Pará (McCANN, 1999), porém, pouco se conhece desse solo, apenas suas características físico-químicas.

Esses solos possuem cor escura, marrom acinzentadas em seus horizontes superiores (Figura 2) (KERN *et al.*, 2003). Além disso, possuem baixos teores de fósforo, poucos indícios de artefatos e cerâmicas, e são constituídos de altos índices de matéria orgânica, comparados aos solos presentes na floresta (KERN *et al.*, 2003).

Alguns autores, como Sombroek (1966) e McCann (1999), consideram as TMs como áreas pré-colombianas, onde o aumento da matéria orgânica do solo e da fertilidade mineral da propriedade indígena ocorreu de forma acidental. Assim, as áreas de TM devem ser o resultado da aplicação intencional de estrume humano ou animal, restos de conchas de moluscos trituradas, permitindo um tipo de horticultura semi-permanente de produção de alimento, uma vez que uma parte do solo da floresta tem sido vigorosamente removida com machados e queimadas subseqüentes.

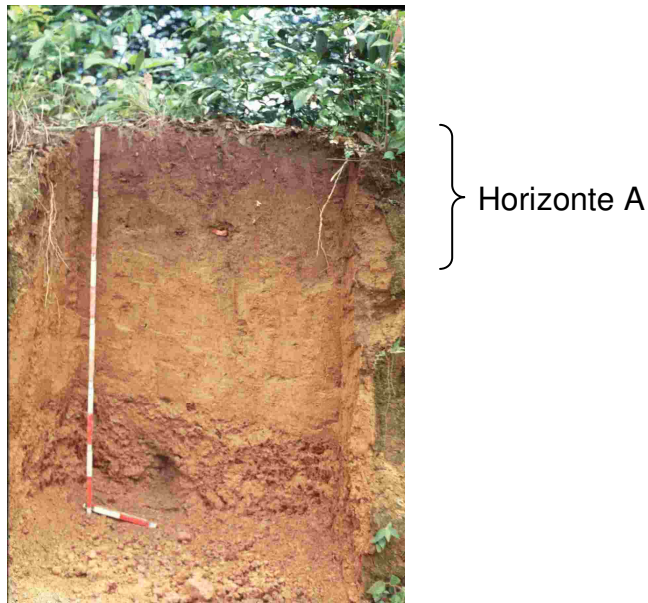


Figura 2 - Perfil do Solo de Terra Mulata, indicando o Horizonte A, com uma maior quantidade de matéria orgânica, e os outros horizontes com maior presença de latossolo

1.4. Diversidade Microbiana do Solo

Os microrganismos estão inseridos em um grupo taxonômico que abrange variados organismos unicelulares presentes nos ambientes mais diversos. Ocorrem em praticamente todos os ambientes do planeta, até mesmo em regiões completamente extremas, e possuem uma simplicidade morfológica e grande variabilidade genética e metabólica, o que contribuiu, portanto, para se tornarem aptos evolutivamente, se desenvolverem em qualquer habitat e em variadas condições, como extremos de temperatura, salinidade e pH (BARNES *et al.*, 1994; MOISSL *et al.*, 2002).

Os procariotos estão divididos taxonomicamente em Archaea e Bacteria e compõem a maior parcela da biota terrestre, sendo que em sua grande maioria, ocupam a superfície terrestre, e aproximadamente 3% ocorrem na água oceânica (LAMBAIS *et al.*, 2005).

O conceito de espécies para o estudo de diversidade de procariotos ainda não foi completamente estabelecido, aumentando a complexidade e dificuldade de

se estudar tais organismos (ROSSELÒ-MOURA, 2001; GEVERS *et al.*, 2005). Além disso, a transferência horizontal que ocorre entre bactérias permite aumentar significativamente a troca genética entre esses organismos, trazendo profundas mudanças evolutivas (COHAN, 2002), dificultando a denominação pela ciência de características específicas necessárias à classificação de espécies em procariotos (LAMMEL, 2007).

Os microrganismos fazem parte do solo de maneira indissociável, sendo responsáveis por inúmeras reações bioquímicas relacionadas não só com a transformação da matéria orgânica, mas também com o intemperismo das rochas. Assim, os microrganismos desempenham papel fundamental na gênese do solo que incluem: a mineralização de matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e energia (RICE *et al.*, 1996; TIMONEN *et al.*, 1996; YAO, 2000; O'DONNELL *et al.*, 2001), fixação de nitrogênio atmosférico (MELO, 1998), decomposição de xenobióticos (MELO e AZEVEDO, 1998; MOREIRA, 2006), produção de compostos responsáveis pela agregação de partículas do solo com melhoria de sua estrutura (TISDALL, 1982; DODD *et al.*, 2000; GLOVER, 2000), atuando, portanto, como fonte de nutrientes para o crescimento das plantas (EHLERS, 1999; AMBROSANO *et al.*, 2000; DAROLT, 2000).

Os microrganismos do solo, também chamados coletivamente de microbiota, são representados por cinco grandes grupos: bactérias, vírus, fungos, algas e protozoários. Apesar de constituírem somente 1 a 4% do carbono total e ocuparem menos de 5% do espaço poroso do solo, a diversidade e a quantidade dos microrganismos é bastante elevada. Os componentes microbianos vivos do solo são também denominados de biomassa microbiana, e as bactérias e fungos respondem por cerca de 90% da atividade microbiana do solo, entretanto, como o

solo é normalmente um ambiente estressante e limitado por nutrientes, somente 15 a 30% das bactérias e 10% dos fungos encontra-se em estado ativo (CATTELAN e VIDOR, 1990; RUEDELL, 1995).

Os microrganismos existentes no solo são partes fundamentais para o equilíbrio de ecossistemas, no processo de fragmentação e na decomposição de matéria orgânica, na disponibilização de nutrientes do solo. Essas atividades são resultantes da grande diversidade, nas diferentes vias metabólicas e na adaptabilidade genética. Esses microrganismos representam uma considerável fração da biomassa da Terra (WHITMAN *et al.*, 1998), podendo acrescentar até 10^4 kg de biomassa de microrganismo por hectare (BRADY e WEIL, 2002). Apesar da abundância, importância e da diversidade, a estrutura das comunidades microbianas e a função desses microrganismos ainda são pouco estudadas (KENT e TRIPLETT, 2002; WARDLE, 2004; LEININGER *et al.*, 2006)

O que distingue o solo de outras formações geológicas é justamente a sua atividade biológica, devido principalmente à diversidade de microrganismos que nele existem (VARGAS e HUNGRIA, 1997). De fato, os microrganismos constituem uma interface biológica com os ambientes físicos e químicos da terra, seja atuando diretamente em processos, como a mineralização da matéria orgânica, ou indiretamente, através de simbioses, como na fixação de nitrogênio (O'DONNELL e GÖRRES, 1999). Novas atividades microbianas no solo têm sido descobertas gerando novos conceitos nos ciclos do carbono, nitrogênio, ferro, manganês e permitindo especular a existência de novos ciclos biogeoquímicos (KELLER e ZENGLER, 2004).

Durante séculos, as informações sobre a diversidade de microrganismos presentes no solo, ou de qualquer ambiente, eram obtidas através de cultivo em

meio de cultura artificiais, métodos nutricionais e bioquímicos (CONN, 1909). Porém, após vários ensaios, Jensen (1968) mostrou que esse tipo de cultivo não estava representando quantitativamente e nem qualitativamente o total da comunidade microbiana presente em nenhum ambiente, além de ser uma limitação para a avaliação taxonômica e filogenética (PACE, 1997), pois esse método não possibilita o cultivo da maioria dos organismos presentes, os microrganismos não-cultiváveis.

Porém, muito de todo conhecimento básico sobre os microrganismos, bem como a descoberta de muitos antibióticos, veio da investigação de culturas puras (ALEXANDER, 1977; QUAISER *et al.*, 2003; STROHL, 2004), e os microrganismos provenientes de cultivos puros continuam sendo importantes para a compreensão da fisiologia, genética e ecologia microbiana (PELLERONI, 1997; ZINDER e SALYERS, 2001).

Na última década, os estudos sobre a diversidade microbiana de solo têm tido grandes avanços devido aos estudos moleculares (TIEDJE *et al.*, 2001), e vêm se tornando de suma importância, pois os estudos sobre amostras ambientais permaneceram por muito tempo inalterado (JOHNSON *et al.*, 2003). Portanto, as ferramentas moleculares baseadas em seqüências genéticas reduzem as limitações antes existentes, revelando novos rumos para ampliar as descobertas sobre a diversidade dos microrganismos.

As seqüências genéticas, baseadas em genes conservados, têm sido utilizadas para a caracterização dos microrganismos não-cultiváveis, além de conhecer sua distribuição e funções no meio ambiente (RONDON *et al.*, 1999). Para os estudos de análise molecular da diversidade, são utilizados trechos de

DNA que sejam informativos do ponto de vista filogenético, sendo o 16S rRNA um gene bastante utilizado (PACE, 1997).

Os estudos de amostras ambientais indicam que os microrganismos procarióticos representam o maior reservatório de diversidade genética do planeta (TORSVIK, 2000). O número total de células procarióticas na Terra é estimado em $4 - 6 \times 10^{30}$, representando uma quantidade de carbono celular de $350 - 550 \times 10^9$ toneladas. Essa quantidade de carbono representa 60 - 100% do carbono total estimado nas plantas. No que diz respeito ao nitrogênio (N) e fósforo (P), os procariotos contêm $85 - 130 \times 10^9$ toneladas e $9 - 14 \times 10^9$ toneladas, respectivamente. Esses valores são cerca de 10 vezes maiores do que o das plantas (WHITMAN *et al.*, 1998).

A extrapolação de resultados obtidos em vários estudos sugere que 1 grama de solo contém cerca de 10 bilhões de procariotos pertencentes a milhares de espécies diferentes (ROSSELÓ-MORA e AMANN, 2001), e este número pode aumentar, pois as espécies microbianas identificadas cresce a cada ano, sendo formalmente descritos mais de 70.000 fungos, 36.000 protozoários, 30.000 algas, 5.000 bactérias e 3.600 vírus, mas esses números ainda estão longe do total de espécies microbianas, estimado em mais de 2 milhões (ROSSELÓ-MORA e AMANN, 2001). A principal razão para o baixo número de espécies formalmente descritas é a necessidade de cultivo celular no processo de identificação dos microrganismos, o que na grande maioria das vezes não é possível (PACE *et al.*, 1986). A perspectiva de uma vasta diversidade de microrganismos não-cultiváveis no solo estimulou o desenvolvimento de técnicas que permitissem o estudo dessas comunidades microbianas independente de cultivo.

Segundo Lambais (2005), o número de espécies descrito vem aumentando, e estima-se que mundialmente, o número de bactérias descritas seja em torno de 4.200 espécies e no Brasil existam cerca de 450 espécies de bactérias descritas e conhecidas (LEWINSOHN e PRADO, 2002). Pesquisas recentes mostraram a biodiversidade microbiana em filosfera de três espécies de árvores da Floresta Amazônica, sendo que uma diversidade de 95 a 671 espécies por amostra foi encontrada (LAMBAIS *et al.*, 2006).

Estudos sobre a diversidade bacteriana usando a técnica de T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) do gene 16S rRNA em amostras de solos de florestas subtropical e tropical mostraram uma predominância dos filos: Proteobacteria, Planctomycetes e Verrucomicrobia (CHAN *et al.*, 2006).

A caracterização biológica de um solo a partir da determinação da estrutura populacional das suas comunidades microbianas contribuirá para a elucidação da origem e formação da TPA, e para a compreensão do impacto sofrido nas populações desses solos, das alterações ao longo dos anos e da sustentabilidade dos sistemas produtivos nesses ambientes. Determinações da biomassa microbiana (PARKINSON e PAUL, 1982), taxas de respiração do solo (HEINEMEIER *et al.*, 1989) e taxas de transformação de nutrientes (HARRISON *et al.*, 1990) são usadas para obter informações mais detalhadas nas atividades microbianas envolvidas nos processos ecológicos fundamentais no solo.

1.5. A utilização de DNA em estudos moleculares da biodiversidade.

O termo diversidade para a biologia é geralmente utilizado para descrever o número de espécies presentes em um habitat. Em termos moleculares, a diversidade é caracterizada pelo número de diferentes tipos de seqüências de DNA encontradas no ambiente (LIESACK *et al.*, 1997).

O uso da informação contida no DNA vem sendo utilizado para estudos filogenéticos e fitogeográficos, tendo como objetivo, a conservação e manejo dos mais variados organismos. Em meados dos anos 80, surgiram várias metodologias moleculares para a análise de diversos organismos, inclusive da diversidade dos solos (BORNEMAN *et al.*, 1997).

O uso de marcadores moleculares para investigar a estrutura e a diversidade de comunidades microbianas tem possibilitado o desenvolvimento de uma nova metodologia no estudo dos aspectos característicos da ecologia desses microrganismos (WARD *et al.*, 1992). Um marcador molecular confiável para análises filogenéticas deve possuir as seguintes características: ser distribuído universalmente; ser estrutural e funcionalmente homólogo; permitir o alinhamento das seqüências e as mudanças nas seqüências devem ocorrer proporcionalmente à distância evolucionária. Desse modo, os marcadores moleculares atuam como relógios moleculares, que pode ser definido como uma molécula cuja seqüência muda aleatoriamente com o tempo, segundo uma velocidade constante de mudança (nucleotídeos por milhão de anos). Baseados no produto, tempo versus velocidade de mudança, pode-se determinar a relação filogenética entre duas seqüências de organismos diferentes provindas de um ancestral comum (WOOSE, 1987).

Em 1965, Zuckerkandl e Pauling anteviram o futuro dos estudos em filogenia e evolução usando a comparação de seqüências de proteínas para inferir as relações evolutivas entre organismos. Considerando-se que existe um grande número de seqüências de um dado tamanho ou composição, as similaridades entre as seqüências indicam uma origem comum das proteínas ou genes correspondentes e podem ser usadas para a reconstrução da genealogia molecular (LUDWING e SCHLEIFER, 1994).

Com o advento das modernas técnicas de seqüenciamento genético (SANGER *et al.*, 1977), não apenas as proteínas, mas também muitos genes passaram a ser utilizados como marcadores moleculares. Lloyd e Sharp (1993) utilizaram seqüências do gene *recA* de 25 espécies para estabelecer relações filogenéticas entre elas. Mollet *et al.* (1997) utilizaram a seqüência do gene *rpoB*, que codifica para a subunidade β da RNA polimerase, com a mesma finalidade. Rosado *et al.* (1998) estudaram a variabilidade das seqüências do gene *nifH* em amostras de solo e no gênero *Paenibacillus* sp.

Entretanto, a morfologia, fisiologia bacteriana e muitas outras propriedades não são informativas o suficiente para serem utilizadas como marcadores filogenéticos, e geralmente ocorre agrupamentos de microrganismos que são essencialmente diferentes (PACE, 1997).

Uma outra técnica muito utilizada é do gene 16S rRNA, que revolucionou o campo da ecologia microbiana e, com seu uso, é possível investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas do meio ambiente (HENTSCHEL *et al.*, 2002).

Estudos com o gene 16S rRNA iniciaram com o microbiologista americano Carl Woese, que anunciou este gene como um excelente marcador molecular

para estudos filogenéticos (ATLAS e BARTHA, 1998), pois possuíam domínios altamente conservados e intercalado por seqüências variáveis (HEAD *et al.*, 1998)

O RNA ribossomal está entre as macromoléculas mais conservadas durante a evolução nos seres vivos, e possui um papel funcional de processamento codificante de informações que deve ter sido estabelecido nas primeiras formas de vidas ancestrais comum de bactéria, arqueia e eucarioto. Devido às unidades funcionais em grandes porções dos genes rRNA serem bem conservadas, suas seqüências podem ser usadas para medir distâncias filogenéticas, mesmo entre microrganismos mais distintamente relacionados.

As variações nas seqüências nucleotídicas mostram os indícios de mudanças evolucionárias (ATLAS e BARTHA, 1998), o que pode ajudar na avaliação da diversidade de amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (WEISBURG *et al.*, 1991; HEAD *et al.*, 1998).

O gene 16S rRNA é uma das moléculas que compõe, juntamente com outras 21 proteínas, a subunidade menor do ribossomo nos Domínios Archaea e Bacteria. Sua estrutura secundária possui pareamentos diferentes do proposto por Watson-Crick (A-U e C-G) e várias hélices oriundas do pareamento intra-cadeia que são numeradas a partir da extremidade 5' da molécula (WOESE *et al.*, 1983). O número total de hélices e sua localização são características usadas para separar grupos filogenéticos (Figura 3) (DAMS *et al.*, 1988). O 16S rRNA possui também 9 regiões variáveis, alternadas com regiões conservadas, denominadas de V1 a V9. Estas regiões podem ser utilizadas para determinação de filogenia, juntamente com as regiões das hélices (WOESE *et al.*, 1983; DAMS *et al.*, 1988). Áreas variáveis podem ser usadas para estudar as relações evolutivas entre dois

organismos muito próximos, já as áreas conservadas, podem ser usadas para revelar relações antigas entre duas moléculas.

Baseado no modelo da estrutura secundária do 16S rRNA de *E. coli*, Van der Peer *et al.* (1996) determinaram um mapa de substituição para cada base nitrogenada da molécula (Figura 3). A variabilidade de cada sítio nucleotídico é definida como sua taxa evolutiva relativa à média da taxa evolutiva de todos os sítios nucleotídicos da molécula. Assim os autores demonstraram que os sítios mais variáveis possuem uma taxa de substituição até sete mil vezes maior do que aqueles com a menor taxa de substituição e também que existem bases em certas posições que são absolutamente conservadas entre diferentes filios bacterianos.

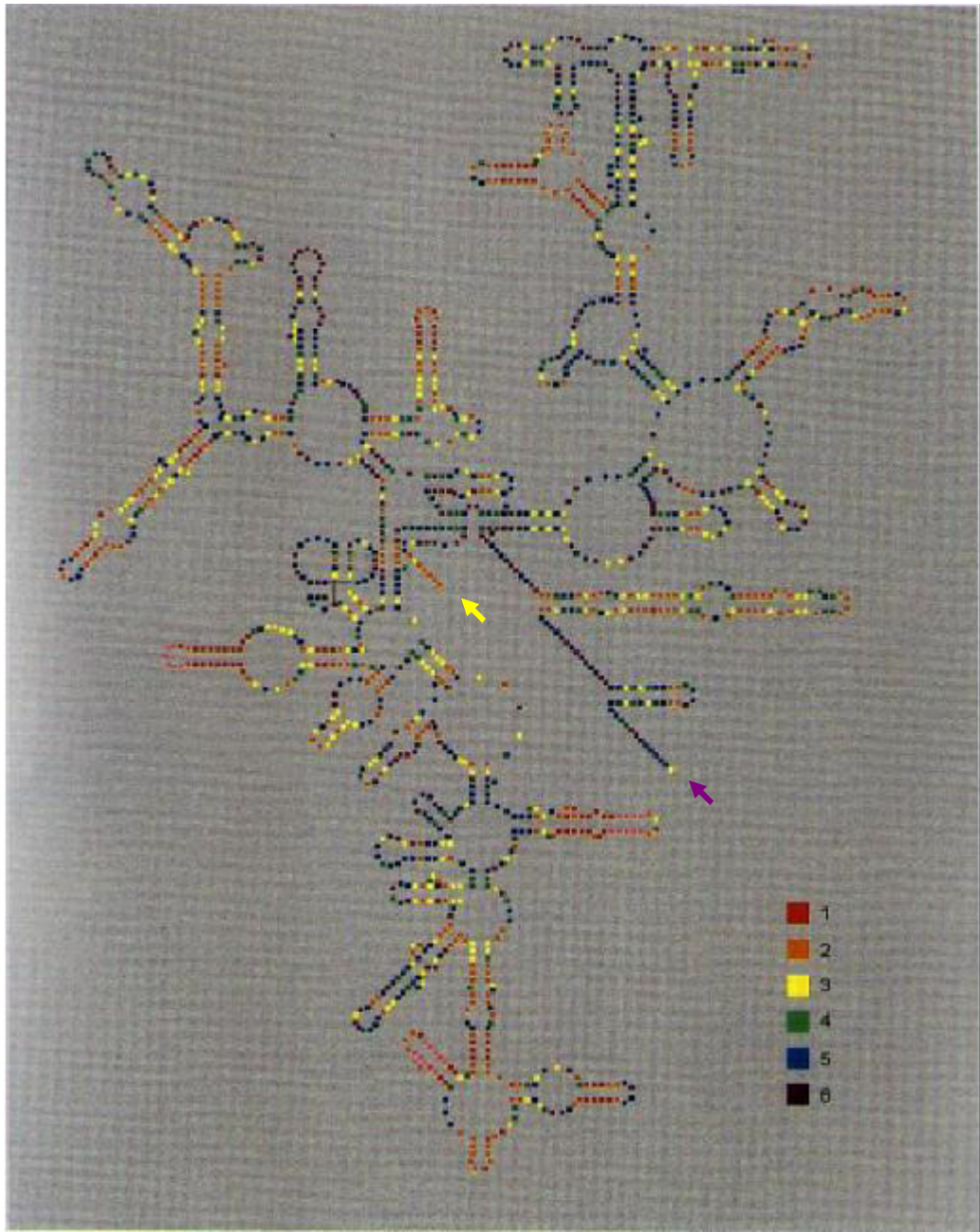


Figura 3 - Mapa de substituição de nucleotídeos do 16s rRNA proposto por Van der Peer *et al.* (1996): nucleotídeos estão divididos em grupos de variabilidade crescente sendo as bases em vermelho as mais variáveis, e as em preto as menos variáveis. Posições absolutamente conservadas são apresentadas em roxo. Molécula apresentada no sentido 5' (seta amarela) → 3' (seta roxa)

1. 6. Biblioteca 16S rRNA de solos amazônicos

Segundo TORSVIK *et al.* (1990), citado por THIES e SUZUKI (2003), as Terras Pretas de Índio podem apresentar alguns bilhões de microrganismos por grama de solo, representados por centenas de diferentes espécies. Entretanto, os estudos sobre a microbiologia desses solos ainda são muito escassos, apesar da importância dos mesmos na pedogênese e, certamente, na sustentabilidade dos ecossistemas terrestres.

BATISTA *et al.* (2004) isolaram e identificaram fungos e bactérias de Latossolo Amarelo e de Terra Preta de Índio, em diferentes localidades no Estado do Pará. O estudo da diversidade microbiana apresenta muitos obstáculos, como as dimensões microscópicas dos objetos de análise, descrições taxonômicas incompletas e inexistência de meios de isolamento e cultivo apropriados para a maioria dos microrganismos.

Estudos na área de Ecologia Molecular Microbiana vêm se desenvolvendo desde a década de 80, utilizando diferentes técnicas para análise das comunidades microbianas. Isto ocorreu devido ao surgimento de metodologias moleculares desenvolvidas nas últimas décadas, que foram padronizadas e adaptadas para superar as limitações impostas pela abordagem clássica de estudo de populações microbianas, evitando o isolamento e cultivo dos microrganismos, e mudaram drasticamente a perspectiva da diversidade microbiana (HANDELSMAN *et al.*, 1998).

Esses estudos se tornaram possíveis devido ao desenvolvimento de técnicas de biologia molecular para a extração, amplificação e análise de seqüências de DNA diretamente dos solos, sem a necessidade de isolamento e cultivo dos microrganismos. Vários métodos de extração de DNA de solo já estão disponíveis

na literatura (GARBEVA *et al.*, 2004; MAZZOLA, 2004), e basicamente, eles envolvem a ruptura das células microbianas presentes na amostra de solo, liberando o material genético (DNA) que é posteriormente purificado tornando-o apto para uso em reações de biologia molecular, como restrição enzimática, amplificação de seqüências específicas pela Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), hibridização, entre outros. A clonagem e o sequenciamento do gene 16S rRNA é bastante utilizado para a exploração da diversidade microbiana em amostras ambientais (MUYZER, 1999).

Uma estratégia utilizada para ampliar os conhecimentos dos componentes dessas comunidades em um ambiente é o processo de clonagem, seguido de análises que nos permite obter informações sobre a variabilidade, e também sobre as relações filogenéticas, dos organismos presentes no ambiente, possibilitando a construção de bibliotecas ambientais de 16S rRNA.

A clonagem de um gene consiste em inserir o DNA em um vetor (um exemplo é o plasmídeo bacteriano), e considerando que uma colônia de bactérias pode corresponder à multiplicação de uma só célula, essa colônia constitui em um clone. Portanto, quando se faz uma extração de plasmídeo, obtêm-se então várias cópias desse gene para outras manipulações.

Essas estratégias foram adotadas como ferramenta padrão para analisar a diversidade de muitos ambientes diferentes, revelando a descoberta de novos grupos de organismos, nunca antes cultivados (HUGENHOLTZ *et al.*, 1998). Entretanto, essas metodologias não permitem ter acesso ao potencial metabólico desses novos organismos, uma vez que as etapas de isolamento e cultivo são suprimidas dos estudos.

Inúmeros trabalhos vêm investigando sobre a posição filogenética entre os microrganismos obtidos por cultivo e por amplificação direta, e o outro através da clonagem do gene 16S rRNA utilizando-se de um vetor. Esses dois tipos de análises misturam frações diferentes de comunidades bacterianas, o que demonstra diferenças significativas entre os dois tipos de estudos, dependentes de vários fatores, como a complexidade do ambiente a ser examinado, e o mais importante, o tamanho da biblioteca de clones de 16S rRNA (DUNBAR *et al.*, 1999). Além das bibliotecas de 16S rRNA, pode-se construir bibliotecas para fungos (utiliza-se da fração 18S rRNA).

A construção da biblioteca de 16S rRNA envolve vários métodos de clonagem genômica, usando a fragmentação de DNA do solo, inserção deste DNA em um sistema de vetor apropriado e a transformação de hospedeiros com os vetores recombinantes. Embora pareça um processo simples, o tamanho do genoma e um grande número de clones são necessários para uma melhor análise da diversidade microbiológica presente em uma amostra de solo (HENNE *et al.*, 1999).

As análises da diversidade e a comparação de organismos procariotos são baseadas em grau de similaridade entre as seqüências 16S rRNA, as quais são agrupadas em OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) ou filotopos (NUBEL *et al.*, 1999, STACH *et al.*, 2003). As seqüências com similaridades maiores que 97% são consideradas da mesma espécie, até 95% são consideradas sendo do mesmo gênero (NUBEL *et al.*, 1999; SCHLOSS e HANDELSMAN, 2005). O uso das OTUs é extremamente apropriado para comparar a riqueza de um dado ambiente, quando é avaliada a seqüência 16S de uma mesma região (STACH *et al.*, 2003)

Existem bancos de dados públicos que são utilizados para a comparação de seqüências do gene 16S, sendo eles o “GenBank[®]” (NCBI) e o “Ribosomal Database Project II” (RDP II) (COLE, 2008). Esses bancos de dados permitem a determinação das relações filogenéticas das seqüências de 16S rRNA obtidas com as seqüências depositadas (CURY, 2006). As seqüências são alinhadas com seqüências gerais de rRNA através de um modelo que incorpora informações sobre a estrutura secundária da molécula aumentando a confiabilidade. O RDP possui também um sistema de classificação taxonômica (“RDP Hierarchy”) que segue a proposta do Manual de Bergey (GARRITY *et al.*, 2004), onde os principais níveis taxonômicos permanecem.

A maioria dos estudos realizados com TPA aborda aspectos geológicos e antropológicos, sendo que os aspectos biológicos, como a diversidade microbiana do solo, ainda é pouco conhecida. São poucas as informações detalhadas e organizadas sobre a diversidade, assim como estudos sobre o efeito de manejo de TPAs que caracterize a função específica da biodiversidade dEsses solos no desenvolvimento de sua fertilidade sustentável (TSAI, 2003).

A falta de informação sobre a diversidade do solo pode ser suprida pela metodologia da construção da biblioteca de 16S rRNA, pois a mesma ajuda a esclarecer a diversidade microbiana no solo de Terra Preta de Índio e Latossolo Amarelo, bem como a possível descrição de novas espécies no grupo (ou Divisões). Por isso, esta pesquisa tem uma grande importância para a Região Amazônica, pois tendo como objetivo estudar a diversidade microbiana em solos de TPA e seus respectivos solos adjacentes (Terra Mulata), espera-se ter contribuído para suprir as deficiências de informações sobre a região, bem como,

poder ilustrar a relação entre as comunidades bacterianas e de arqueias presentes nesses solos.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATLAS, M.; BARTHA, R. 1998 Microbial ecology: Historical development. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial ecology. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, p 2-26a.
- ATLAS, M.; BARTHA, R. 1998. Microbial evolution and Biodiversity. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial ecology. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, p 27-57
- ATLAS, M.; BARTHA, R. 1998. Microorganisms in their natural habitats: air, water, and soil microbiology. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial ecology. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, p 333-337
- ALEXANDER, M., 1997. Biodegradation of organic compounds in organic solids or in nanopores within silica particles. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2215–2221.
- BATISTA, J.L.F. 2004. Restoration of seasonal semideciduous forests in Brazil: influence of age and restoration design on forest structure. *Forest Ecology and Management*, Amsterdam, v.191, p.185-200.
- BIRD, M.L.; NOYO, C.; VEENENDAAL, E.M.; LLOYD, J.; FROST, P. 1999. Stability of elemental carbon in savana soil. *Global Biogeochemical Cycles*, Washington, v. 13, p. 923-932.
- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. 1997 Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 63, p. 2647-2653.
- BRADY, M. 2001. Baltic Sea Nitrogen agricultural abatement and ecosystem adaptation models. Sveriges lantbruksuniversitet. Uppsola
- CATTELAN, A.J.; VIDOR, C. 1990 Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função das variações ambientais. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, v. 14, p. 133-142.
- CHAN, O.C.; YANG, X.; FU, Y.; FENG, Z.; SHA, L.; CASPER, P.; ZOU, X.; 2006. 16S rRNA gene analyses of bacterial community structure in the soils of evergreen broad-leaved forest in south-west China. *FEMS Microbiol. Ecology*, Amsterdam, v. 58, p. 247-259
- COHAN, F. 2002 What are bacterial species? *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 56, p. 457-487,
- COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. 2008. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.*, v. 37, p.141-145.

- CONN, H. J. 1909 Future methods of soil bacteriological investigations. *Centbl. Bakt.*, II Abt. 25, 454-457.
- DAMS, E.; HENDRIKS, L.; VAN DE PEER, Y.; NEEFS, J-M.; SMITS, G.; VANDENBEMPT, I.; WACHTER, R. 1988 Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res.*, v. 16, p. 87-173.
- DENEVAN, W. 1972. The aboriginal population of Amazonia. In: DENEVAN, W. (Ed.). *The native population of the Americas in 1492*. Madison: University of Wisconsin. p. 205-234.
- DOOD, J.C.; BODDINGTON, C.L.; RODRIGUEZ, A.; GONZALES-CHAVES, C.; MANSUR, I. 2000 Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. *Plant and Soil*, v. 226, p. 131-151.
- DROZDOWICZ, A. 1997 Bactérias de solo. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. *Biologia dos solos de cerrado*. Platina: Embrapa/CPAC.
- DUNBAR, J.; TAKALA, S.; BARNS, S.M.; DAVIS, J.A.; KUSKE, C.R. 1999 Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA cloning. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 1662-1669.
- EHLERS, E. 1999 *Agricultura sustentável: origens e perspectivas de um novo paradigma*. 2ª ed. Guaíba: Agropecuária, p. 157.
- FALESI, I.C. 1972. O estado atual dos conhecimentos sobre os solos da Amazônia Brasileira, In: Instituto de pesquisa agropecuária do Norte (Belém, PA). *Zoneamento agrícola da Amazônia: 1ª aproximação*. Belém, PA (IPEAN). p. 17-67.
- FARIAS, N.A.F.; OLIVEIRA, L.A. 1994. Uso de microorganismos solubilizadores de fosfatos em pupunheira num latossolo da região amazônica. Resumos do III SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, Londrina, PR, junho de 1994.
- FELSKE, A.; WOLTERINK, A.; VAN LIS, R.; DE VOS, W.M.; AKKERMANS, A.D.L. 1999 Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 30, p. 137-145.
- FERREIRA, R.S. 2006. Influência do silício na indução de resistência à mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) e no desenvolvimento vegetativo em dois cultivares de soja *Glycine max* (L.) Merrill. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 40p.
- FRANKEN, W.; LEOPOLDO, P.R.; BERGAMIN FILHO, H. 1985. Fluxo de nutrientes através de águas naturais em floresta de terra firme na Amazônia Central. In: *Workshop on Biogeochemistry of Tropical Rain Forest: Problems for Research*. Proceedings. Piracicaba, São Paulo. p. 29-37.

- GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v. 42, p. 243-270.
- GARRITY, G.M.; WINTERS, M.; SAERLES, D.B. 2002. Taxonomic outline of procaryotic genera Bergey's Manual of systematic bacteriology. 2^o ed. New York: Springer Verlangh, New York, Inc,
- GEVERS, P.; COHAN, F.M.; LAWRENCE, J.G.; SPRATT, B.G.; COENT, T; FEIL, E.J.; STACKEBRANDT, E.; Van PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F;L.; SWINGS, J. 2005 Re-evaluating procaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 3, p. 1733-1739.
- GLASER, B.; BALASHOV, E.; HAUMAIER, L.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. 2001. Black carbon in density fractions of anthropogenic soils of the Brazilian Amazon region. *Organic Geochem.*, v. 31. p. 669-678.
- GLOVER, J.D.; REGANOLD, J.P.; ANDREWS, P.K. 2000. Systematic method for rating soil quality of conventional, organic, and integrated apple orchards in Washington State. *Agric., Ecosystem Env.*, v. 80, p. 29-45.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.*, v. 5, p. 245-249,
- HARRISON, S.R. 1990. Regression of a model on real-system output: an invalid test of a model validity. *Agricultural Systems*, Oxford, v. 34, n. 2, p. 183-190.
- HENTSCHEL, U.; HOPKE, J.; HORN, M.; FRIEDRICH, A.B.; WAGNER, M.; HACKER, J.; MOORE, B.S. 2002. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, p. 4431-4440.
- HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, J. 1998. microbial evolution diversity and ecology: a decade of ribossomal rRNA analysis of uncultivated organism. *Microbial Ecology*, New York, v.35, p. 121.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.*, v. 180, p. 4765-4774.
- JENSEN, M. E. 1968 Water consumptions by agricultural plant growth. New York : Academic, v. 2, p. 1-22.
- KELLER, M.; ZENGLER, K. 2004. Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews*, v. 2, p. 141-150.
- KENT, A. D; TRIPLET, E.W.. Microbial communities and their interactions and their interaractions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Review Microbiology*. Pablo alto, v.56, p. 211-36.

- KERN, D.C.; KÄMPF, N. 1989. Efeitos de Antigos Assentamentos Indígenas na Formação de Solos com Terra Preta Arqueológicas na região de Oriximiná - PA. *Rev. Bras. Sci. Solo*, v. 13, p. 219-25.
- KERN, D.C.; COSTA, M.L. 1997. Composição química de solos antropogênicos desenvolvido em Latossolo Amarelo derivado de lateritos. *Rev. Geociênc.*, v. 16, p. 157-175.
- KERN, D.C.; D'AQUINO, G.; RODRIGUES, T.E.; FRAZÃO, F.J.L.; SOMBROEK, W.; MYERS, T.P.; NEVES, E.G. 2003. Distribution of Amazonian Dark Earths in the Brazilian Amazon. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Eds.). Amazonian Dark Earths: origin, properties and management. cap.4, p. 51-75,
- LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. 2005 Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, p. 43-84, A.P.; CARDOSO, E.J. (Ed). Tópicos em ciência do solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.4
- LADD, J.N.; FOSTER, R.C.; NANNIPIERI, P.; OADES, J.D. Soil structure and biological activity. *Soil Biochem.*, v. 9, p. 23-78, 1996.
- LEHMANN, J.; SILVA, J.P.; STEINER, C.; NEHLS, T.; ZECH, W.; GLASER, B. 2003. Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. *Plant and Soil*, v. 249, p. 343-357,
- LEININGER S, URICH T, SCHLOTTER M, SCHWARK L, QI J, NICOL GW, PROSSER JI, SCHUSTER SC, SCHLEPER C (2006) *NATURE* 442:806–809.
- LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. 2002. Estimativas de biodiversidade brasileira. In: LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. (Ed.). Biodiversidade Brasileira: síntese do estado atual do conhecimento, Estado de São Paulo. p. 91.
- LIESACK, W.; STACKERBRANT, E. 1997 Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from Australian terrestrial environment. *Journal of Bacteriology*. Washington, v. 174
- LIMA, M.R. 2002. O solo no ensino fundamental: Situação e proposições. Curitiba, Universidade Federal do Paraná. 33p.
- LLOYD, A.T.; SHARP, P.M. 1993. Evolution of the *recA* gene and the molecular phylogeny of bacteria. *Mol. Evol.*, v. 4, p. 399-407.
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 15, p. 155-173.

- LUDWIG, W.; BAUER, S.H.; BAUER, M.; HELD, I.; KIRCHHOF, G.; SCHULZE, R.; HUBER, I.; SPRING, S.; HARTMANN, A.; SCHLEIFER, K.-H. 1997. Detection and *in situ* identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 153, p. 181-190,
- LUCAS, Y.; LUIZÃO, F.J.; CHAUVEL, A.; ROUILLER, J.; NAHON, D. 1993. The relation between biological activity of the rain forest and the mineral composition of soils. *Science*, v. 260, p. 521- 523,
- LUIZÃO, F.J.; SCHUBART, H.O.R. 1987. Litter production and decomposition in a terra-firme forest of Central Amazonia. *Experientia*, v. 43, p. 259-265.
- LUIZÃO, F.J. 1989. Litter production and mineral element input to the forest floor in a Central Amazonian forest. *GeoJournal*, v. 19, p. 407-417.
- MAZZOLA, M. 2004. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v. 42, p. 35-59.
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. 1998. *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA. p. 488,
- McCANN, J.M. 1999. Before 1492. The making of the pre-Columbian Landscape. *Ecological Rest.*, v. 17, p. 15-30,
- MOISSL C.; , CHRISTIAN RUDOLPH, AND ROBERT HUBER. 2002. Natural Communities of Novel Archaea and Bacteria with a String-of-Pearls-Like Morphology: Molecular Analysis of the Bacterial Partners. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 68 p. 933–937
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. 2006. *Micribiologia e bioquímica do solo*. Lavras, Ed. UFLA, p. 729,
- MOLLET, C.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.*, v. 26, p. 1005-1011.
- MUYZER, G.; SMALLA, K.; 1998. Application of desnaturing gardiente gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel eletrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. Wageningen, v. 73, p. 127-141.
- NUBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; KUHL, M.; MUYZER, G. 1999. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington, v. 65, p 422-443.
- O'DONNELL, A.G.; GÖRRES, H. 1999. 16S rDNA methods in soil microbiology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 10, p. 225-229,

- O'DONNELL, A.G.; SEASMAN, M.; MACRAE, A.; WAITE, I.; DAVIES, J.T. 2001. Plants and fertilizers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant and Soil*, v. 232, p. 135-145.
- O'NEILL, G.A., HAMANN, A., AND WANG, T. 2006. Accounting for population variation improves estimates of climate change impacts on species' growth and distribution. *Journal of Applied Ecology*. Submitted.
- PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. 1985. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM News*, v. 51, p. 4-12,
- PACE N.R. 1996. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News*, v. 62, p. 463-470.
- PACE, N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, v. 276: p. 734-740.
- PALLERONI N, BRADBURY J 1993. "Stenotrophomonas, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983". *Int J Syst Bacteriol* **43** (3): 606-9.
- PARKINSON, D. Filamentous fungi. In: *Methods of soil analysis: soil science society of America*. Madison: SSSA, 1982. part 2, p. 949-968.
- PEREIRA, E.G. 2000. Diversidade de rizóbios isolados de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia. . 93p.Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- QUAISER, A.; OCHSENREITER, T.; LANZ, C.; SCHUSTER, S.; TREUSCH, A. H.; ECK, J.; SCHELEPER, C. 2003. Actinobacteria from a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Molecular Microbiology*. Oxford. V. 50, p. 563-575.
- RAPPÉ, M.S.; GIOVANNONI, S.J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 57, p. 369-394.
- REICHARDT, K. 1996. Dinâmica da matéria e da energia em ecossistemas. 2.ed. Piracicaba: ESALQ, Depto. de Física e Meteorologia, 160p.
- RICE, C.W.; MOORMAN, T.B.; BEARE, M. 1996. Role of microbial biomass carbon and nitrogen in soil quality. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J. (Ed.). *Methods of assessing soil quality*. Madison: Soil Science Society of America, p. 203-215,
- RONDON, M.R.; AUGUST, P.R.; BETTERMANN, A.D.; BRADY, S.F.; GROSSMAN, T.H.; LILES, M.R.; LOIACONO, K.A.; LYNCH, B.A.; MACNEIL, I.A.; MINOR, C.; TIONG, C.L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M.S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. 2000 Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 66, p. 2541-2547,.

- SANTOS, R.C.A. Propriedades térmicas do solo: um estudo de casos. São José dos Campos: INPE, 1987, 112p. Dissertação Mestrado
- ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; van ELSAS, J.D. 1998 Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 4, p. 2770-2779.
- ROSSELÓ-MORA, R; AMANN, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbial. Technol.*, v. 11, p. 626-644.
- ROTHSCHILD, L.J.; MANCINELLI, R.L. 2001. Life in extreme environments. *Nature*, v. 409, p. 1092-1101.
- RUEDELL, J. 1995. Plantio Direto na Região de Cruz Alta. Cruz Alta: FUNDACEP-FECOTRIGO, p. 134.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 74, p. 5463-5467.
- SESSISTSCH, A.; WEILHARTER, A.; GERZABEK, M.H.; KIRCHMANN, H.; KANDELER, E. 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, p. 4215-4224,
- SCHMIDT, T.M., DELONG, E.F.; PACE, N.R. 1991.. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.*, v. 173, p. 4371-4378,
- SMITH, N.J.H. 1980. Antrosols and human carrying capacity in Amazonia. *Ann. Assoc. Am. Geog.*, v. 70, p. 553-566,
- SMITH, K.P.; GOODMAN, R.M. 1999. Host variation for interactions with beneficial plant-associate microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v. 37, p. 473-491.
- SKJEMSTAD, J.O.; CLARKE, P.; TAYLOR, J.A.; OADES. J.M.; MCCLURE, S.G. 1996. The chemistry and nature of protected in soil. *Austr. J. Soil Res.*, v. 34. p. 251-271,
- SOMBROEK, W.G. 1966 Amazon Soils. A reconnaissance of the Soils of the Brazilian Amazon region. In: Centre for Agricultural Publications and Documentations (Ed.), Dissertation, Vol. 672, Onderzoekingen Verslagen van Landvrouwkundige Wageningen, p. 12-25; 50-57; 120-125; 158-169; 174-191; 220-283.
- STACH, J.E.M., MALDONADO, L.A., MASSON, D.G., WARD, A.C., GOODFELLOW, M., AND BULL,A.T. 2003 Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6189-6200.

- STROHL, W. R. 2004. Antimicrobials, p. 336–355. In A. T. Bull (ed.), *Microbial diversity and bioprospecting*. ASM Press, Washington, D.C.
- THIES, J.; SUZUKI, K. 2003. Amazonian Dark Earths Biological Measurements. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Eds). *Amazonian Dark Earths: origin, properties and management.*, cap. 16, p. 287-332,
- TISDALL, J.M; OADES, J.M. 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *Eur. J. Soil Sci.*, v. 33, p. 141-163,
- TORSVIK, V., J. GOKSØYR, AND F. L. DAAE. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:782–787.
- TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. 2000. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 5, p. 240-245,
- TREUSCH, A.; KLETZIN, A.; RADDATZ, G.; OCHSENREITER, T.; QUAISSER, A.; SCHUSTER, C.; SCHELEPER, C. 2004. Characterization of large-insert DNA libraries from soil for environmental genomic studies of Archaea. *Environ. Microbiol.*, v. 6, p. 970-980.
- TSAI, S.M.; CANNAVAN, F.S.; SILVA Jr., J.P.; CHAVES, M.G.; PASSIANTO, C.C.; BORGES, C.P. 2003 Diversidade Bacteriana em Terra Preta de Índio baseada em sequenciamento do gene 16S rRNA.
- VAN DE PEER, Y.; CHAPELLE, S.; De WACHTER, R. 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res.*, v. 24, p. 3381-3391.
- WARD, B.B. 2003. How many species of prokaryotes are there? *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 99, p. 10234-10236.
- WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, p. 6578-6583,
- WOESE, C.R. 1987 Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, v. 51, p. 221-271.
- WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 87, p. 4576-4579,
- WOESE, C. 1998. The universal ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 95, p. 6854-6859,
- WOLBACH, W.S.; ANDERS, E. 1989. Element carbon in sediments: determination and isotopic analysis in the presence of kerogen. *Geochim. Cosmochim. Acta*, v. 53, p. 1637-1647.

- WOODS, W.I.; McCANN, J.M. 2001. El origen y persistencia de las tierras negras de la Amazonia. In: HIRAOKA, M.; MOURA, S. (Ed.). Desarrollo Sostenible em la Amazônia. Quito. p. 23-30.
- YAO, H.; HE, Z.; WILSON, M.J.; CAMPBELL, C.D. 2000. Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. *Microb. Ecol.*, v. 40, p. 223-237,
- YOUNG, M.I.; CRAWFORD, J.W. 2004. Interactions and self-organization in the soil microbe complex. *Science*, v. 304, p. 1634-1637,
- YUTIN, N.; MAKAROVA, K.S.; MEKHEDOV, S.L.; WOLF, Y.I.; KOONIN, E.V. 2008. The deep archaeal roots of eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.*, v. 25, p. 1619-1630,
- ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. 1965 Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.*, v. 8, p. 357-366,
- ZINDER, S. H., AND A. A. SALYERS. 2001. Microbial ecology—new directions, new importance, p. 101–109. In D. R. Boone and R. W. Castenholz (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1: the *Archaea* and the deeply branching and phototrophic *Bacteria*. Springer-Verlag, New York, N.Y.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Construir bibliotecas 16S rRNA de solos de Terra Preta de Índio e solo adjacente coletados do Município de Presidente Figueiredo (AM), visando comparar a biodiversidade do Domínio Bacteria e do Domínio Archaea entre Esses dois ambientes.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Extração de DNA dos solos de Terra Preta de Índio e de solo adjacente no Laboratório de Tecnologias de DNA do CAM / UFAM;
- ✓ Amplificar, clonar e seqüenciar as regiões 16S do rRNA dos domínio Bacteria e Archaea nos dois diferentes tipos de solo;
- ✓ Verificar a diversidade microbiana presente nos tipos de solos estudados;
- ✓ Relacionar filogeneticamente as espécies bacterianas encontradas;
- ✓ Relacionar filogeneticamente as espécies de arqueias encontradas.

CAPÍTULO 1

Diversidade Bacteriana do Solo de Terra Preta de Índio e Terra Mulata da Amazônia Ocidental.

Batista-Silva, L., Jean Charles Peixoto, Spartaco Altolfi-Filho, Luciana Leomil

INTRODUÇÃO

O Domínio Bacteria constitui um grupo de microrganismos de ocorrência cosmopolita nos mais diversos *habitats* e apresenta 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 a luz como fonte de energia no metabolismo (fototróficos) (CANHOS *et al.*, 1999).

Estudos baseados na análise direta da diversidade bacteriana em amostras ambientais através de métodos moleculares, sem a etapa de isolamento e cultivo, têm revelado um novo cenário sobre a distribuição de microrganismos no meio ambiente. Os resultados indicam que alguns grupos do Domínio Bacteria apresentam distribuição cosmopolita, ao passo que outros, parecem estar restritos a ambientes particulares (SCHLEGEL e JANNASCH, 1992). Alguns dos grupos filogenéticos de distribuição cosmopolita são bem descritos a partir de estudos de isolamento e cultivo, porém outros são ainda pouco conhecidos/estudados ou não foram ainda encontrados pelo método de cultivo.

Os representantes de Proteobacteria (bactérias púrpura fotossintéticas), *Cytophagales* (grupo dos *Bacteroides/Cytophaga/Flexibacter*) e as duas divisões de organismos Gram-positivos de distribuição cosmopolita (*Actinobacteria* e Gram-positivos com baixo conteúdo de G+C) são exemplos de microrganismos cultivados bem descritos na literatura. Ao contrário, microrganismos das Divisões *Acidobacterium*,

bactérias verdes não-sulfurosas e *Verrucomicrobia*, que também apresentam distribuição cosmopolita evidenciada por estudos de seqüências de 16S rRNA do meio ambiente, são pouco representados por organismos cultivados e, conseqüentemente, pouco se sabe sobre a sua biologia e propriedades em geral (Hugenholtz *et al.*, 1998a).

Microrganismos litotróficos e as comunidades que eles suportam contribuem significativamente para a química da biosfera, atuando nos ciclos biogeoquímicos e processos de lixiviação de rochas e formação de solos. O metabolismo litotrófico, com produção de energia a partir de compostos inorgânicos, tais como hidrogênio e compostos reduzidos de ferro e enxofre, é mais amplamente distribuído entre os grupos filogenéticos de Bacteria que as formas de metabolismo fototrófico e organotrófico (KANDLER, 1994; PACE, 1997).

Ambientes que permitem a ocorrência de microrganismos litotróficos, como *habitats* abaixo da superfície terrestre e *habitats* geotermiais, são mais prevalentes na Terra que ambientes ricos em matéria orgânica. Considerando a importância do metabolismo litotrófico nos processos ambientais, é notável a relativa falta de informação sobre a diversidade e biologia desses organismos e sobre as comunidades que eles vivem. Um dos fatores que contribuem para a falta de conhecimento são as limitações para o isolamento e cultivo desses em laboratório.

Segundo Hugenholtz *et al.* (1998a, b), o Domínio Bacteria compreende pelo menos 36 divisões, que é um termo para definir um grupo filogenético que contém duas ou mais seqüências de 16S rRNA monofiléticas e não afiliadas com outros grupos filogenéticos (HUGENHOLTZ *et al.*, 1998a,b). Estas divisões, no Domínio Bacteria podem ser: as 12 divisões baseadas principalmente em seqüências de 16S rRNA de microrganismos cultivados, já descritas por Woese (1987); as 12 prováveis novas divisões, descritas em estudo recente envolvendo a análise de seqüências de 16S

rRNA isoladas diretamente do meio ambiente (HUGENHOLTZ *et al.*, 1998a); e as 12 linhas de descendência descritas em outros estudos (MAIDAK *et al.*, 1997).

Segundo estimativas realizadas por Lewinsohn *et al.* (2002), existem de 300 a 450 espécies bacterianas descritas e conhecidas no Brasil, e para o ambiente mundial não alcança o número de 4.200 espécies. Porém, esta complexa diversidade bacteriana ainda tem que ser estudada (MARGULIS *et al.*, 1998), e existem diversos índices para calcular a população procariota, mas todos concordam em um aspecto: a diversidade dos microrganismos de solo é gigantesca (WARD, 2003).

Atualmente, bactérias e arqueias compreendem um total de 4.167 espécies com descrição taxonômica válida, distribuídas em 791 gêneros (http://www.dsmz.de/bactnq_m/bactname.htm). A classificação hierárquica dos táxons no Domínio Bacteria pode ser encontrada no site do “National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy Homepage” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/tax.html>).

A Figura 1 mostra as divisões alocadas no Domínio Bacteria, de acordo com a classificação filogenética construída com base na comparação de seqüências do 16S rRNA. Os estudos filogenéticos, até o momento, não foram capazes de resolver a ordem das ramificações das divisões no Domínio Bacteria. A diversidade bacteriana é vista como uma radiação de diferentes grupos filogenéticos, representados pelas divisões, à exceção da divisão Aquificales, que ramifica-se mais profundamente nas árvores filogenéticas na maioria dos estudos (Hugenholtz *et al.*, 1998a,b).

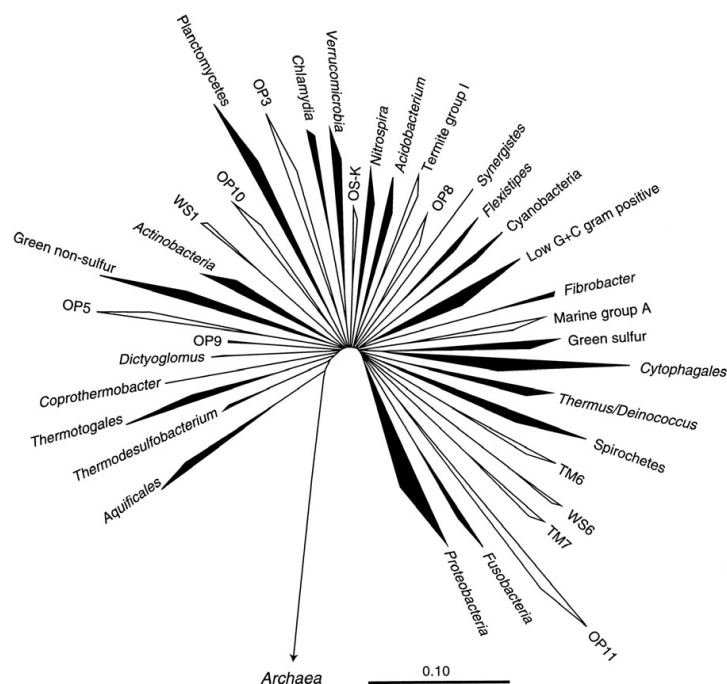


Figura 01 - Árvore Filogenética do Domínio Bacteria proposta por Hungenholz *et al.* (1998b): a árvore apresenta 36 Filos bacterianos. Setas preenchidas indicam filis com representantes cultivados; e setas não preenchidas indicam filis compostos por indivíduos não-cultivados. A barra de escala representa 0,1 mudança nucleotídica por posição

Rappé e Giovannoni (2003), baseados no estudo de seqüências do gene 16S rRNA amplificadas a partir do DNA total de amostras ambientais de diversos locais, sugerem 52 filis bacterianos, porém apenas 24 filis são reconhecidos pelo Manual de Bergey. Isto demonstra que ainda a taxonomia de microrganismos tende a se modificar, principalmente o solo que se apresenta dominado por pequeno número dEsses filis, tornando possível o surgimento de “novas divisões” com o surgimento de resultados proveniente de futuros estudos (Figura 02) (GARRITY, 2004).

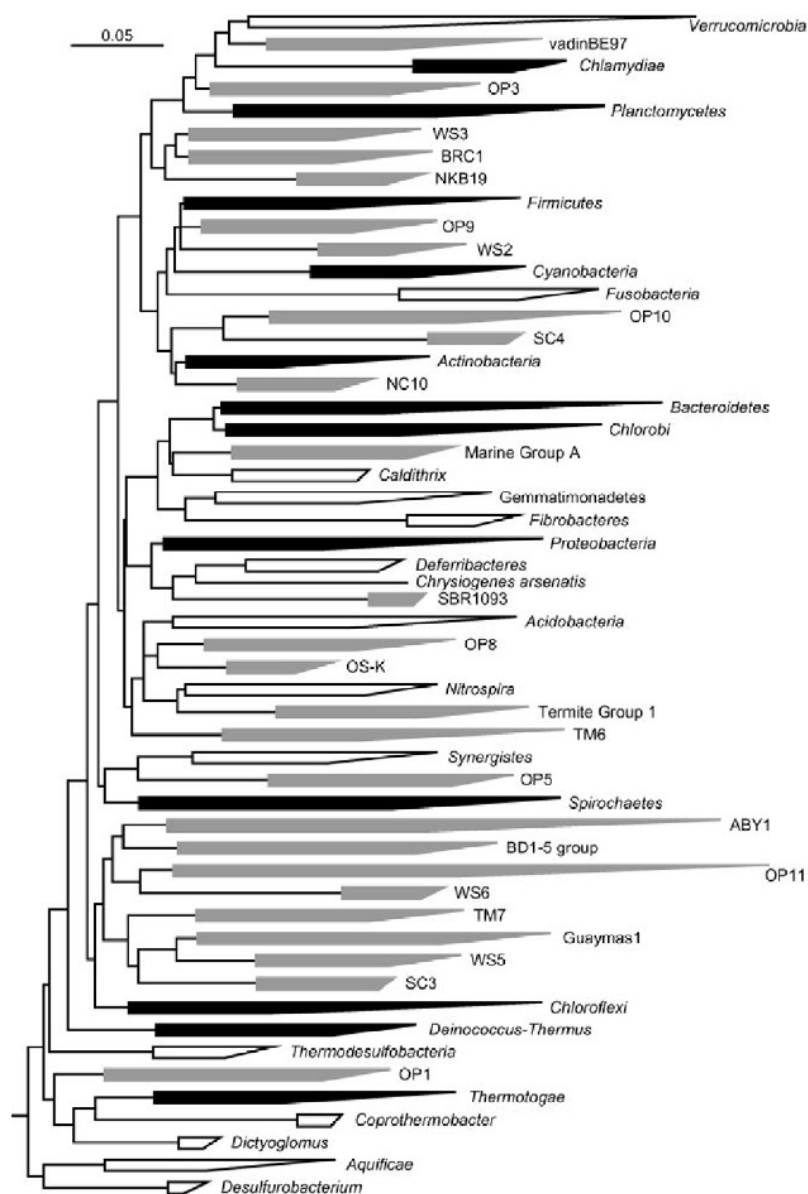


Figura 02 - Árvore Filogenética do Domínio Bacteria proposta por Raapé e Giovannoni (2003): árvore apresenta 52 filós bacterianos. Setas preenchidas representam os 12 filós originais (bactérias Gram-negativas foram divididas em Firmicutes e Actinobacteria, descritos por Woese, 1987); não preenchidas, os filós que possuem representantes cultivados reconhecidos desde 1987; e em cinza estão os 26 filós candidatos que não possuem representantes cultiváveis conhecidos. A barra de escala representa 0,05 mudanças nucleotídicas por posição

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

Foram realizadas duas coletas de solo de Terras Pretas de Índios e de solo adjacente, no Município de Presidente Figueiredo (Amazônia Ocidental) no Estado do Amazonas. A primeira coleta foi realizada na comunidade Rumo Certo a 187 Km de Manaus. As coordenadas geográficas da área de coleta para o solo de Terra Preta de Índio (TPI) são 02° 01' 52,5" S - 059° 26' 28,3" W, e da área da Terra Mulata são 02° 01' 56,1" S - 059° 26' 24,2" W. O clima da região é Tropical, sendo quente e úmido, com temperaturas médias entre 25°C e 35°C. A vegetação é formada por Floresta Tropical, com terras acidentadas com Planície, Vertente e Baixio.

Coleta e Preparo das Amostras de Solo

O solo foi coletado de cada sítio na posição horizontal com tubos policloreto de vinila (PVC) de 5 cm de diâmetro (limpos com Etanol 70%), nas profundidades de 0 - 10; 10 - 20; 20 - 30; 30 - 40 e 40 - 50 cm. De cada profundidade, foram retiradas quatro amostras de solo com os tubos de PVC. Essas amostras foram acondicionadas em sacos plásticos de polietileno em caixas de isopor com gelo seco, para manter sua umidade durante o transporte e, posteriormente, foram armazenadas em temperatura a 4°C (duas amostras de PVC) e a -20°C (outras duas amostras). No laboratório, as amostras foram separadas em sub-amostras para a extração do DNA e para análises físico-químicas.

Análise do material para avaliar teores de macro e micro nutrientes

As determinações analíticas das amostras de solo foram efetuadas no Laboratório do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) na Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba (SP) sob supervisão da Profa. Dra. Siu Mui Tsai. As amostras do solo foram analisadas para pH, Cobre, Zinco, Manganês, Ferro, Boro, Fósforo, Potássio, Cálcio, Magnésio, Alumínio, Hidrogênio, Enxofre, Antimônio.

Análises Físicas do Solo – Granulometria

A separação dos sólidos de um solo, em diversas frações é o objetivo do peneiramento. Este processo é adotado para partículas (sólidos) com diâmetros maiores que 0,075mm. Este processo divide-se em peneiramento grosso, partículas maiores que 2 mm e peneiramento fino, partículas menores que 2mm.

Para o peneiramento de um material granular, a amostra é, inicialmente, secada em estufa e seu peso determinado. Esta amostra será colocada na peneira de maior abertura da série previamente escolhida e levada a um vibrador de peneiras onde permanecerá pelo tempo necessário à separação das frações.

Após a secagem em estufa, as amostras foram colocadas em placa de petri, coloca-se 10 mL de peróxido de hidrogênio para eliminar a matéria orgânica, pois a matéria orgânica se liga aos outros materiais e pode alterar o teor de argila. Tampou-se com vidro de relógio. Ficou overnight. Foi colocada então 10 mL de dispersante, que ficou por 24 horas, este dispersante serve para separar as partículas de areia, argila e silte. Após essa etapa, as amostras são colocadas em provetas de 1 litro onde as amostras ficaram decantando. Cada amostra foi colocada em um agitador por 15 min com água destilada. Após a agitação, as amostras foram peneiradas em uma peneira de 0,053, onde será separada a argila, silte e areia. A

areia vai para um placa de petri e colocada em estufa a 105 C por 24 hrs. O restante do material foi para uma proveta de 1000 mL em temperatura ambiente. Esse matéria ficou 24 hrs decantando. Após essa etapa as amostras forma pesadas.

Extração e Quantificação de DNA genômico de solo

Do material coletado, aproximadamente 0,5 g do solo homogeneizado foi transferido para microtubos de 1,5 mL para extração de DNA genômico. A extração do DNA foi realizada utilizando o protocolo de extração e orientações do fabricante do kit de extração comercial “Ultra Clean Soil DNA Purification Kit” (USA - MOBIO® - Catálogo 12800-50). Após a extração de DNA, foi realizada a sua quantificação pela corrida de eletroforese em gel de agarose na concentração 0,8% a 80 Volts, corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) e as amostras foram visualizadas em transiluminador em luz ultravioleta.

Amplificação do gene 16S rRNA pela PCR

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada pelo protocolo da reação da PCR, como descrito em CRUMP *et al.* (1999), com modificações, e consiste de um volume final de 25 µL (25 mM MgCl₂; 2,5 mM DNTPs; 5 pmol/µL de cada iniciador; 1,25 U/µL de *Taq* DNA polimerase; Tampão 10X). Os iniciadores universais para o gene 16S rRNA utilizados nesse trabalho estão descritos a seguir:

Domínio Bacteria: CRUMP *et al.* (1999)

- 16S f (5' - TTG GAG AGT TTG ATC CTG GCT C - 3')
- 16S r (5' - ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC - 3')

O perfil térmico da PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação por 2 minutos a 94°C, seguido por 25 ciclos, como se segue: desnaturação de fitas-molde

por 40 segundos a 94°C, pareamento dos iniciadores por 30 segundos a 58°C, e extensão por 1 minuto a 72°C. E um ciclo final de extensão por 5 minutos a 72°C. Em seguida, foi realizada uma corrida das amostras pela eletroforese em gel de agarose na concentração 0,8% a 80 Volts, corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) e visualizado em transiluminador em luz ultravioleta.

Clonagem do gene 16S rRNA

Purificação dos Produtos da PCR

Os produtos da PCR foram purificados antes da ligação do vetor de clonagem utilizando-se o Kit “GFX PCR - DNA and Gel Band Purification KIT” (Amersham Biosciences® - Catálogo 27-9602-01), seguindo as recomendações do fabricante. Essa metodologia consistiu em colocar uma coluna de GFX em um “tubo de coleta” para cada purificação realizada; e acrescentou 100 µL de tampão de captura ao produto da PCR e transferiu essa solução à coluna GFX. O mesmo foi centrifugado a 13.400 rpm por 30 segundos, sendo a fase líquida descartada, e em seguida, for adicionado 200 µL do tampão de lavagem à coluna, que foi centrifugado a 13.400 rpm por 30 segundos; novamente o líquido do tubo de coleta foi descartado e a coluna GFX foi transferida para um microtubo novo de 1,5 mL (microtubo comum); e o DNA foi eluído em 50 µL do tampão de eluição (DDH₂O estéril) diretamente sobre a matriz na coluna GFX.

Sistema de Ligação

O sistema de ligação foi realizado utilizando o Kit “TOPO TA Cloning for Sequencing” (Invitrogen) como segue: 1^o ng/mL do vetor; 4,0 µL do produto da PCR purificado; 1,0 µL da solução de sal diluído, tendo 10 µL como volume final. Em

seguida, a reação foi misturada gentilmente e foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, sendo depois armazenada a -20 °C.

Transformação genética

A transformação seguiu o procedimento de acordo com o fabricante do Kit “Transforming One Shot Mach - T1 Competent Cells” (Invitrogen). Do sistema de ligação, 2 µL foi adicionado a 50 µL da célula competente, que foram eletroporadas a 1.900 Volts. Após a eletroporação, 1 mL de meio SOC. Foram colocada na cubeta para eletroporação para a recuperação do sistema + vetor. Essas células foram incubadas sob agitação por 1 hora a 37 °C, sendo em seguida, semeadas em placas de meio Luria-Bertani (LB) com Ampicilina (200 µg/mL). As placas semeadas foram incubadas durante 18 horas a 37 °C. As colônias brancas foram transferidas para microplacas de 96 poços contendo 150 µL de LB e ampicilina. Depois foram acrescentados 50 µL de glicerol 50% em cada poço, e congelados a -80 °C até a realização das reações de seqüenciamento.

Extração Plasmidial - Mini-prep

As colônias brancas foram coletadas com auxílio de palitos estéreis e transferidas pra microplaca *Deep-Well* com 96 poços, contendo 1,5 mL de meio Circle Grow acrescido com ampicilina (100µg mL⁻¹). A placa foi selada com filme adesivo e cada poço foi perfurado com agulha estéril para a aeração da bactéria. Os clones foram incubados sob agitação orbital (shaker) a 320 rpm, por 22 hrs.

Após o crescimento, foram transferidos 100 µL de células para placa estéril contendo 100 µL de glicerol 50%. A placa foi selada e as células estocadas a -80°C.

A partir das placas armazenadas a -80°C, 240 µL de GET foi acrescentado a cada poço, e agitada por 2 minutos (para ressuspender bem as células). Em seguida, foram centrifugadas a 4.000 rpm durante 9 minutos. As placas ficaram invertidas em papel absorvente por 5 minutos. Foi adicionada mais 80 µL de GET em cada poço, e agitadas por 2 minutos, para ressuspender as células. Depois, foi adicionada em cada poço de uma microplaca 1,5 µL de RNase (10 mg/mL) e 60 µL da suspensão de células foi transferida para a microplaca. Em cada poço, foi adicionado 80 µL de NaOH 0,2N / Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 1%, e as microplacas foram incubadas durante 10 minutos em temperatura ambiente. Depois, foi acrescentado em cada poço 80 µL de KOAc 3M e misturou-se 30 vezes por inversão. Novamente, as microplacas foram incubadas durante 10 minutos em temperatura ambiente, e foram centrifugadas a 4.000 rpm, durante 10 minutos, a 20°C. Previamente, foi fixada com fita adesiva, uma placa Millipore (MAGV N22) no topo de uma microplaca de fundo em "V". Todo o volume do sobrenadante (evitando transferir os debris celulares) foi transferido para a placa Millipore e centrifugadas (sem a tampa) a 4.000 rpm, durante 5 minutos e 30 segundos, a 20°C ou até todo o volume descer para a outra placa (fundo em "V"). Após a centrifugação, a placa Millipore foi descartada. Na microplaca de fundo em "V", foi adicionada 100 µL de Isopropanol (Merck) e centrifugada a 4.000 rpm, durante 45 minutos, a 20°C. Depois foi adicionado 200 µL de Etanol 70% (Merck) gelado, e centrifugada a 4.000 rpm, por 5 minutos, a 20°C. O sobrenadante foi removido e as microplacas foram invertidas sobre papel absorvente e para retirar qualquer resquício de álcool, as mesmas foram centrifugadas a 900 rpm ("pulso") a 20°C. As

placas foram secas durante 1 hora em temperatura ambiente, e cobertas com papel toalha. O DNA foi ressuspenso com 60 µL de DDH₂O, e deixado durante 18 horas a temperatura ambiente.

Seqüenciamento do Gene 16S rRNA

A reação de seqüenciamento consistiu do seguinte protocolo: 4,0 µL do Pré-Mix (“DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for Mega BACE” - Amersham Biosciences®); 1,0 µL de cada iniciador a concentração de 5,0 pmol/µL; 1^o ng/µL de DNA molde; 4,0 µL de DDH₂O autoclavada, para um volume final de 10,0 µL. Os iniciadores utilizados foram:

- Domínio Bacteria: 16S r (5' - ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC - 3')

O perfil térmico da reação de seqüenciamento consistiu de 20 ciclos, como se segue: desnaturação de fitas-molde por 3 minutos a 95°C, pareamento dos iniciadores por 30 segundos a 95°C e extensão por 30 segundos a 60°C. E um ciclo final de extensão por 1 minuto e 20 segundos a 60°C.

Precipitação do produto da reação de sequenciamento de DNA

A precipitação foi realizada após a reação de sequenciamento para eliminar todos os produtos que não foram incorporados. Em cada poço foi colocado 1 µL de acetato de amônio a 7,5 M e 27,5 µL de Etanol 100% que foi homogeneizado e deixado durante 10 minutos em temperatura ambiente e depois, centrifugado a 4.000 rpm por 40 minutos. Após este processo, o sobrenadante foi descartado por inversão, foi adicionado 120 µL de Etanol 70%, e centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão e deixado para secar por 15

minutos em temperatura ambiente, e ressuspensas com “Loading Solution”. O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador capilar Mega BACE (Amersham Biosciences®), conforme recomendações do fabricante.

Processamento e Análise das Seqüências

As seqüências obtidas foram processadas para a remoção de vetor e de seqüências de baixa qualidade (índice de qualidade < 20) utilizando-se os programas “PHRED/PHRAP” (GREEN, 1996). As seqüências foram trimadas usando o Programa Cross-Match. Cada seqüência foi comparada com seqüências depositadas no “GenBank®” (NCBI), utilizando-se o Programa de busca avançada “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST - NCBI), para identificação das espécies procarióticas. Após esta comparação, as seqüências foram conferidas, alinhadas e editadas com o auxílio dos programas BioEdit 5.0.9 (HALL, 1999) e Chromas 2.23 (<http://www.techenesium.com.au>).

Análises Filogenéticas e Estatísticas.

Para as análises de relações filogenéticas das seqüências de nucleotídeos foi utilizado o programa Análise Genética de Evolução Molecular MEGA 2.1 (KUMAR *et al.*, 2001), pelo método da construção neighbor-joining (SAITOU e NEI, 1987) com algoritmos Jukes-Cantor (JUKES *et al.*, 1969). Os ramos da árvore gerada foi inferida pelo índice de bootstrap com 1000 replicas em cada nó, onde poderão ser visualizadas as espécies e subespécies proximamente relacionadas.

Para análises estatísticas, foi realizada quanto ao grau de diferenças significativas entres as seqüências nucleotídicas, pela comparação de suas curvas homólogas, pelo programa DOTUR (SCHOLL *et al.*, 2004). Nessa análise, as

curvas homólogas das amostras, formadas pela relação entre as distâncias evolutivas e as coberturas de amostragem, foram comparadas, sendo calculadas as diferenças entre os pontos equivalentes da curvas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Coleta e caracterização dos solos

As amostras de solos de Terra Preta de Índio (TPI) e de Terra Multa (TM ou ADJ) que foram utilizadas foram utilizadas para construção das bibliotecas foram as profundidades 10, 20 e 30 cm, por apresentarem maior diversidade bacteriana, conforme descrito por Tsai *et al.* (2003). Após a coleta, foram realizadas as análises químicas e físicas das amostras no Laboratório do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) na Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba (SP), cujo resultados estão descrito abaixo.

Através das análises químicas, as amostras de TPI (tabela 1) mostraram valores baixíssimos de pH quando comparados com os solos de TM, confirmando os valores encontrados por LIMA *et al.* (2002) e por FALCÃO (2006). Foram observados também altos teores de cálcio (Ca) e fósforo (P), porém baixa saturação por alumínio, conforme descrito por KERN (1989) e LEHMANN *et al.* (2002). Outra característica encontrada nos solos de TPI foi o alto valor da capacidade de troca catiônica (CTC), quando comparados com os solos de TM. Esses valores confirmam a elevada fertilidade desses solos, pois a CTC é muito importante para a retenção de nutrientes e de água, sendo que o valor desta capacidade varia com o teor e a natureza da argila, mas principalmente com o teor de matéria orgânica.

As análises físicas (Tabela 2) mostraram que os solos de TPI e TM são diferentes entre si, pois o primeiro possui uma elevada quantidade de silte e argila (o que dificultou a obtenção de DNA mais íntegro, já que o mesmo pode ficar retido por mais tempo no solo), e o segundo demonstrou ter uma grande quantidade de areia.

Tabela 1 - Resultado das análises químicas das amostras de TPI e TM, realizadas na Laboratório do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) na Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba (SP)

Amostra	Cu g/dm ³	Zn g/dm ³	Mn g/dm ³	Fe g/dm ³	B g/dm ³	pH CaCl ₂	MO g/dm ³	P g/dm ³	K g/dm ³	Ca g/dm ³	Mg g/dm ³	Al g/dm ³	H g/dm ³	S g/dm ³	CTC g/dm ³	Sat
TP1 (10)	1,6	1,6	16,8	49	0,52	4,7	55	17	0,6	54	8	2	98	7	160,6	3
TP1 (20)	1,7	1,1	14,4	47	0,43	4,6	50	15	0,6	38	5	4	88	8	131,6	8
TP1 (30)	0,6	0,6	5,6	27	0,34	3,6	25	34	0,1	3	1	19	166	6	170,1	82
ADJ1 (10)	0,2	0,5	7,7	240	0,37	4,4	54	11	1,1	35	9	5	80	7	125,1	10
ADJ1 (20)	-1,0	-1,0	1,0	94	0,40	3,7	23	4	0,3	6	1	16	121	3	128,3	69
ADJ1 (30)	-1,0	-1,0	0,6	56	0,31	3,7	21	2	0,1	2	1	19	109	5	112,1	86
TP2 (10)	0,4	36,4	3,5	29	0,16	4,5	47	65	0,5	25	7	5	80	2	112,5	13
TP2 (20)	0,4	46,4	2,5	26	0,13	4,6	40	59	0,3	24	5	3	80	3	109,3	9
TP2 (30)	0,4	15,2	2,0	27	0,22	4,6	25	29	0,2	19	2	3	52	4	73,2	12
ADJ2 (10)	-1,0	0,9	1,2	153	0,22	3,5	23	8	0,4	1	1	17	80	4	82,4	88
ADJ2 (20)	-1,0	0,2	0,7	36	0,25	3,8	28	2	0,2	1	1	15	98	1	100,2	87
ADJ2 (30)	0,3	13,0	1,9	26	0,22	4,6	23	22	0,2	20	2	3	52	1	74,2	12

Cu: **cobre**; Zn: **zinco**; Mn: **manganês**; Fe: **ferro**; B: **boro**; MO: **matéria orgânica**; P: **fósforo**; K: **potássio**; Ca: **cálcio**; Mg: **magnésio**; Al: **alumínio**; H: **hidrogênio**; S: **sódio**; CTC: **capacidade de troca catiônica**; Sat: **saturação**

Tabela 2 - Resultados das análises físicas encontrados nas amostras de TPI e TM, pela técnica de granulometria

Amostras	Areia 2.00 - 0.05 mm	Silte 0.05 - 0.002 mm	Argila < 0.002 mm
TP2 10cm	58,88	22,62	18,50
TP2 20cm	53,4	18,10	28,50
TP2 30cm	57,93	13,57	28,50
ADJ210cm	83,15	8,35	8,50
ADJ220cm	68,68	22,82	8,50
ADJ230cm	70,88	8,62	20,50

Extração de DNA genômico total do solo

As extrações de DNA genômico total dos solos foram realizadas com três repetições para cada amostra de solo, TPI e TM (ou TADJ), usando o “Kit Power Soil DNA Isolation” (MOBIO®). O DNA das amostras de solo foi extraído foi satisfatória, obtendo uma boa quantidade e qualidade de DNA, como mostrado no gel de agarose a 0,8%, (figura em anexo) além disso, foi realizada a quantificação dos DNA por espectrofotômetro (Tabela 3).

Tabela 3 - Quantificação de DNA de cada amostra utilizada nessa pesquisa pela leitura do espectrofotômetro

Amostras	260/280	DNA Ratio	DNA (µg/mL)	Proteína	Resultado Final (ng/ µL)
TP2 (10)	0.077 / 0.052	1.481	2.971	22.39	73.15
TP2 (20)	0.025 / 0.024	1.042	0.709	18.32	23.75
TP2 (30)	0.069 / 0.059	1.169	2.216	39.31	65.55
ADJ2 (10)	0.019 / 0.018	1.056	0.547	13.55	18.05
ADJ2 (20)	0.025 / 0.025	1.000	0.673	19.87	23.75
ADJ2 (30)	0.023 / 0.023	1.000	0.619	18.28	21.85

Amplificação e purificação do gene 16S rRNA

Com o DNA obtido, foram realizadas Reações da Polimerase em Cadeia (PCR) com iniciadores específicos do gene 16S rRNA para os Domínios Bacteria. Os produtos da PCR amplificados geraram fragmentos de 1.500 pb para o Domínio Bacteria (Figura 03 e 04) apresentando assim, produto suficiente para a realização das clonagens. Para minimizar a formação de moléculas quiméricas, pois isso é possível quando se utiliza uma mistura de DNA genômico de diferentes espécies com o gene 16S rRNA (WANG e WANG, 1997), foram modificados o número de ciclos da PCR dos trabalhos originais, diminuindo de 30 para 25 ciclos.

As moléculas quiméricas são formadas por mais de uma seqüência de organismos, e quando estas seqüências são comparadas com os bancos de dados, podem ser identificadas como sendo uma nova espécie ou não-classificada, sugerindo assim a presença de um indivíduo ainda não descrito. A principal causa da formação das moléculas quiméricas é a presença de fitas simples de DNA terminadas prematuramente, especialmente nos ciclos finais da PCR, que reanelam com uma fita diferente concluindo a amplificação (PAABO *et al.*, 1992).

Wang et al (1997) realizaram estudos *in vitro* a partir de uma mistura de DNA genômico de oito espécies diferentes de Actinomicetos para minimizar a formação das moléculas quiméricas, e observou uma taxa de formação de 32% de moléculas quiméricas em uma PCR de 30 ciclos, e numa reação com 25 ciclos, esta taxa diminuiu para 12%.

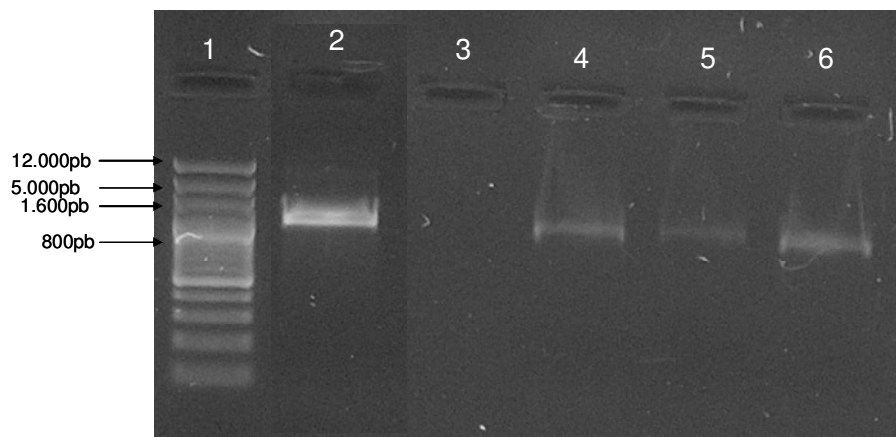


Figura 03 - Perfil eletroforético da amplificação do gene 16S rRNA para o Domínio Archea em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etídeo. 1) Padrão Molecular 1 kb Plus DNA (Invitrogen); 2) Controle positivo (amostra padrão); 3) Controle negativo; 4) Amostra de solo TP2 10 cm; 5) Amostra de solo TP2 20 cm; 6) Amostra de solo TP2 30 cm.

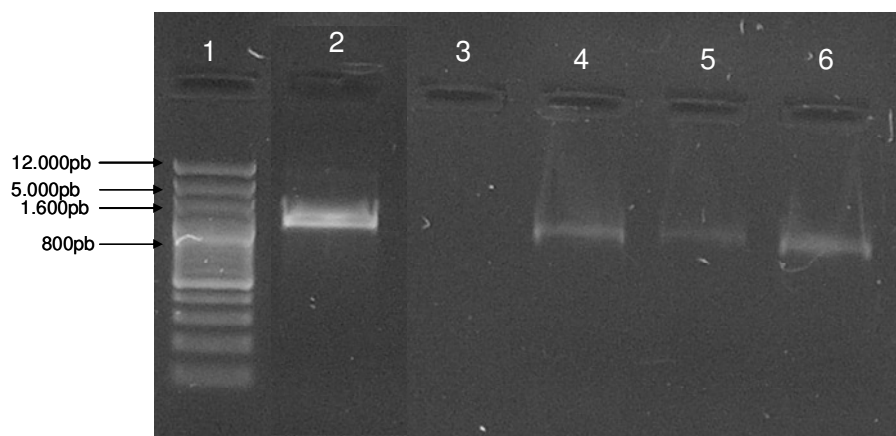


Figura 04 - Perfil eletroforético da amplificação do gene 16S rRNA para o Domínio Bacteria em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etídeo. 1) Padrão Molecular 1 kb Plus DNA (Invitrogen); 2) Controle positivo (amostra padrão); 3) Controle negativo; 4) Amostra de solo TP2 10 cm; 5) Amostra de solo TP2 20 cm; 6) Amostra de solo TP2 30 cm.

Construção das Bibliotecas 16S rRNA

Foram construídas duas bibliotecas a partir dos produtos de PCR purificados, para o Domínio Bacteria, a qual denominamos de TPBact (referente ao solo de Terra Preta de Índio) e TABact (referente a Terra Mulata ou Adjacente).

Foram selecionados 960 clones transformantes para a biblioteca TPBact e 960 clones para TABact. Para a confirmação da inserção dos fragmentos no vetor de clonagem, foram realizadas reações de PCR utilizando os iniciadores específicos, e o gene M13 foi utilizado para confirmar a presença do fragmento de tamanho desejado. O perfil da amplificação foi visualizado em gel de agarose a 0,8%, corado em brometo de etídio e visualizado em fotodocumentador com auxílio de luz ultravioleta.

Sequenciamento parcial dos clones e Análise das seqüências

A extração do DNA plasmidial dos clones e a reação de seqüenciamento foram feitas em larga escala, 96 amostras por placa. Foram seqüenciados 3.264 clones, sendo 960 clones pertencentes a cada biblioteca (TPBact e TABact)

Para esse estudo, foi realizado o sequenciamento parcial, pois o objetivo do mesmo foi avaliar a diversidade e não realizar um estudo evolutivo, e também, devido ao alto custo que esta metodologia exige. Por isso justifica-se a utilização de um único iniciador, e não os dois iniciadores que são comumente usados. Para as duas bibliotecas do Domínio Bacteria foi utilizado o iniciador 16S F (“forward”).

Nas análises das seqüências realizadas pelos programas Phred/Phrap/Consed, disponíveis no site de Bioinformática da UFAM, foram descartadas as seqüências com bases de baixa qualidade (< 20), onde se encontra

apenas um erro em cada 100 pb lidos. No final desta análise, foram obtidas então, 420 clones de TPBact, 405 clones de TABact (Tabela 4).

Tabela 4 - Número total de clones seqüenciados e clones obtidos pertencentes às bibliotecas: TPBact e TABact

Biblioteca	Clones seqüenciados	Clones obtidos
TPBACT	960	420
TABACT	960	405

As seqüências obtidas foram comparadas com o banco genômico no “GenBank[®]” do NCBI, onde foi utilizada a ferramenta BLAST, visando a identificação das amostras encontradas. Para corroborar os resultados e obter dados mais completos, as seqüências foram analisadas no programa “Classifier” disponível no site RPD II. O programa apresenta os mais altos níveis taxonômicos e segue a proposta do Manual de Bergey (Garrity *et al.*, 2004).

Em todas as seqüências comparadas utilizando o BLAST, apresentaram um índice de similaridade que variou entre 85 a 100%, e não foram observadas seqüências ainda não cadastradas. Porém, em alguns casos, a pontuação de confiabilidade se mostrou baixa, o que nos remete a idéia de serem seqüências de 16S rRNA não catalogadas no “GenBank[®]”. Isso pode acontecer, pois a riqueza e a diversidade bacteriana presentes nos solos é pouco explorada, necessitando de mais estudos para a detecção desses microrganismos.

Análise da diversidade das comunidades bacterianas

Para a análise da diversidade, seja em ambiente terrestre, marinha e até mesmo em humanos e animais, o Domínio Bacteria tem sido muito estudado. Nesse trabalho, todas as seqüências analisadas deste Domínio tiveram um índice

acima de 95% de confiança, sendo que o maior número de seqüências identificadas nas duas bibliotecas foi de organismos não-cultiváveis (ou não-conhecidos), representando 38% das seqüências em TPBact (Figura 5), e 58% em TABact (Figura 6).

Esses achados não são diferentes do que tem sido descrito na literatura, pois em um levantamento de dados realizado por Cole *et al.* (2008), a partir de seqüências mantidas no “Ribosomal Database Project” (RDP), num total de 676.998 que foram depositadas, 643.916 foram de bactérias e 33.082 de arqueias, destas, 142.511 (21,1%) foram descritas como de microrganismos cultiváveis e 534.487 (78,9%) de amostras ambientais (não-cultiváveis).

O Domínio Bacteria é composto de 23 Filos determinados com base nas seqüências do gene 16S rRNA, sendo que alguns desses filos constituem em poucas seqüências de espécies, enquanto em outros Filos (*Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria*), ocorrem milhares de espécies que correspondem a 93% de todas que já são conhecidas (NUNES, 2006).

O Filo *Acidobacteria* foi o mais predominante nas duas bibliotecas, representando 20% do total de seqüências na TPBact e 11% para TABact. Sobre os outros Filos encontrados na TPBact, podemos destacar: *Nitrospira* e *Firmicutes*, com freqüência de 8% e 7%, respectivamente: *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* e *Proteobacteria* (5%), *Cloroflexi* (3%), *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Sphigobacteria* e *Verrucomicrobia* (2%) (Figura 05). Já na biblioteca TABact, os Filos em destaque foram: *Sphigobacteria* com freqüência de 5%, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* (4%), *Betaproteobacteria* e *Firmicutes* (3%); *Aquificae* e *Proteobacteria* (2%), e por fim, *Nitrospira* que aparece em maior número na biblioteca TPBact, porém nessa apenas 1% (Figura 06).

Resumidamente percebe-se que há uma diferença entre as duas bibliotecas quanto aos Filos encontrados, mostrando que a diversidade encontrada é consequência dos tipos de solos pesquisados, e o fato de algumas bactérias estarem envolvidas ou não em alguns processos ecológicos ou fisiológicos nesses solos, só ajuda nessa grande diversidade. Além disso, esse estudo com diversidade envolvendo a Biologia Molecular, nos remete a questão de como devemos explorar mais esses microrganismos para o benefício da Natureza e até mesmo do Homem, bem como também pode nos auxiliar na descrição das novas espécies.

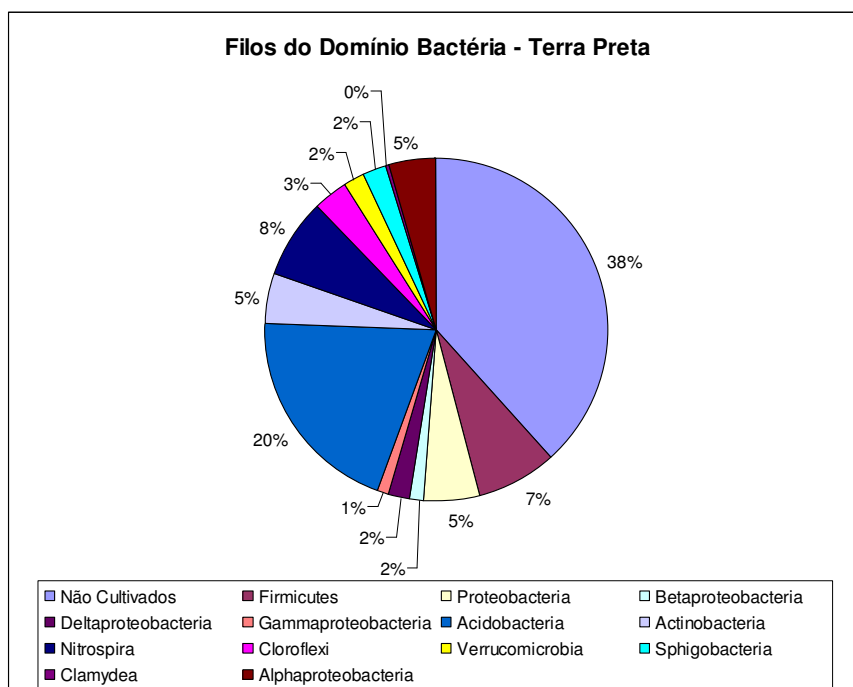


Figura 05 - Diversidade bacteriana encontrada nos clones 16s rRNA do solo TPI com base nos dados obtidos pela comparação nos bancos de dados do NCBI e RDP II

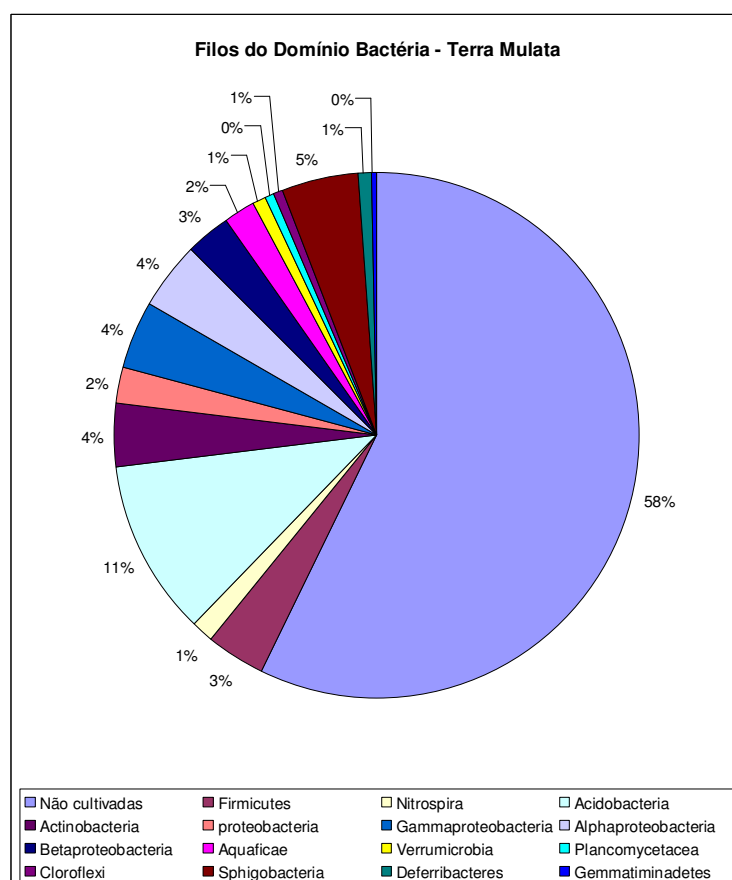


Figura 06 - Diversidade bacteriana encontrada nos clones 16s rRNA no solo TM (ou TA) com base nos dados obtidos pela comparação nos bancos de dados do NCBI e RDP II

A seguir, serão descritas algumas características desses Filos descritos nesse trabalho, para auxiliar e esclarecer os tipos de espécies envolvidas em uma comunidade.

Filo *Acidobacteria*

O filo *Acidobacteria* possui poucos representantes isolados e caracterizados até o momento, e é composto de espécies ácidos-tolerantes que contém em uma Família e Ordem, apenas 3 gêneros: *Acidobacterium capsulatum*, *Holophaga foetida* e *Geotrix fermentans* (GARRITY, 2001; HOLT 2001).

A. capsulatum foi o primeiro representante desse filo, sendo um organismo heterotrófico, aeróbico e moderadamente acidófilo (HIRASHI, 1995); *H. foetida* é um

organismo anaeróbico que fermentam compostos aromáticos (LIESACK *et al.*, 1994) e *G. fermentans* um organismo anaeróbico que fermentam compostos de acetato (LONERGAN *et al.*, 1996).

Devido ao advento da Biologia Molecular e das análises do gene 16S rRNA, segundo Quaiser *et al.* (2003), esse grupo de bactérias tem sido detectado em vários ambientes, como: marinho, terrestre, animais, aerossóis e fontes termais, mas especialmente em solos, onde são muito representativos. Muitos estudos sugerem que os mesmos podem ter um componente ecológico significativo em diversos ecossistemas (HUNGENHOLTZ *et al.*, 1998; DUNBAR *et al.*, 2002; BARNS *et al.*, 2007).

Seqüências do gene 16S rRNA desse grupo de bactérias foram encontradas em várias localidades do mundo nos mais diversos tipos de solo, como por exemplo na Ásia (MITSUI *et al.*, 1997), na Austrália (LIESACK, 1992), Américas (BORNEMAN *et al.*, 1996; TRIPLETT, 1997) e na Europa (FELSKE *et al.*, 1998; HACKL *et al.*, 2004).

Corroborando com esses trabalhos, foram encontradas OTUs em abundância nas duas bibliotecas de bactérias (20% TPBact e 11% TABact), demonstrando que elas devem ter sua grande importância ecológica, por ser descrita em todos os lugares do Mundo. Um dado que talvez possa justificar a alta quantidade encontrada deste Filo na Floresta Amazônica, é a análise química dos solos pesquisados, pois estas bactérias podem ter preferência por ambientes mais ácidos, e como observado na Tabela 2, os solos de Terra Preta mostraram um pH ácido em torno de 4,0, enquanto as amostras de Terra Adjacente mostraram um pH extremamente ácido, em torno de 3,7 (KIM *et al.*, 2007; CANNAVAN, 2008).

Filo *Proteobacteria*

Os microrganismos que fazem parte desse Filo possuem um metabolismo muito diversificado (MARGULIS, 1998; SCHWARTZ, 1998), incluindo os autotróficos e heterotróficos, aeróbios e anaeróbios. Pela elevada diversidade fisiológica, é o Filo predominante em ecossistemas que possuem uma grande variedade de condições ambientais para o estabelecimento de populações de procariotos e sua presença foi observada nas duas bibliotecas do Domínio Bacteria, TPBact e TABact, com um índice de 5% e 2%, respectivamente.

Esse Filo possui cinco subdivisões: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*, e dentre elas, a subdivisão *Alphaproteobacteria* foi encontrada em uma maior frequência nas duas bibliotecas (TPBact - de 5%; TABact - 4%), mas a subdivisão *Epsilonproteobacteria* não foi obtida em nenhuma das bibliotecas.

Os microrganismos encontrados no grupo das *Alphaproteobacteria* são descritos principalmente no solo e em água doce, com poucos representantes marinhos (CHO, 2003; GIOVANNONI, 2003). Possui 11 Famílias (GARRITY, 2003; BELL; LILBURN, 2003), sendo o gênero *Bradyrhizobium* o mais conhecido e o mais estudado, por ser uma bactéria aeróbia, Gram-negativa, e fixadora de nitrogênio atmosférico quando associada às leguminosas. Algumas características do solo podem afetar a nodulação e/ou a fixação do N₂ de leguminosas junto à vasta variedade de estirpes de *Rhizobium* (KAMICKER e BRILL, 1986), tais como condições de baixa fertilidade do solo, elevadas doses de nitrogênio combinado, o efeito da rizosfera, tensão da água, pH, salinidade, temperatura, toxinas e predadores (GRAHAN e TEMPLE, 1984).

A segunda subdivisão descrita em nosso trabalho foi a *Betaproteobacteria*, 2% na biblioteca TPBact e 3% na TABact. São bactérias quimioautotróficas, com grande diversidade morfológica e cresce com energia fornecida por compostos inorgânicos para a produção de compostos orgânicos, convertem nitrogênio, enxofre e metanol, e também são fixadoras de nitrogênio, portanto, são importante para o ciclo de nitrogênio, enxofre e carbono.

Dentro dessa subdivisão, um número expressivo da Ordem *Burkholderia* foi encontrado nessa pesquisa, uma bactéria com amplo potencial agrícola e biotecnológico, promotoras de crescimento em plantas com fixação biológica de nitrogênio, além de produtores de biopolímeros (YABUUCHIN, 1992). Além disso, ela possui um papel importante na biodegradação de compostos naturais, sendo capaz de utilizar uma grande variedade de substratos (FREITAG, 2004; PROSSER, 2004).

Segundo Garrity e Holt (2001), a taxonomia da subdivisão *Deltaproteobacteria* ainda é muito dinâmica e está suscetível a constantes reclassificações, mas ela é encontrada em todos os solos já pesquisados, e também foi descrita em nosso trabalho, mas com pouca frequência em relação às outras subdivisões (TPBact 2% e TABact 3%), com apenas duas seqüências que foram classificadas na Ordem *Bdellovibrionales* (Família *Bacteriovaraceae*). Nesse grupo, existem bactérias predadoras de outras Gram-negativas (DAVIDOV, 2004; JURKEVITCH, 2004); possui distribuição ubíqua na natureza, podendo ser encontrada em ambientes como solos, rizosfera, mares, rios, biofilmes e esgoto (WILLIAMS *et al.*, 1995; JURKEVITCH *et al.*, 2000).

A última subdivisão a ser descrita é a *Gammaproteobacteria*, foi encontrada em ambas as bibliotecas, TPBact 1% e TABact 4%, e elas são caracterizadas por

serem encontradas em grande freqüência em solos, e estão distribuídas em 13 Ordens (GARRITY, 2001). Elas também possuem uma grande importância médica, pois contém as Ordens *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* e *Pseudomonaceae*.

Dentro da Família *Enterobacteriaceae*, foi encontrada na biblioteca TPBact uma seqüência do gênero *Serratia*, bactéria Gram-negativa, facultativamente anaeróbia e em forma de bastonete, que pode ser descrita em ambiente natural (solo, água e superfícies de plantas), mas também como patógenos oportunistas para o homem (BASILIO, 2007)

Uma outra seqüência encontrada dentro da biblioteca TPBact, foi do gênero *Legionella*, onde se encontra uma bactéria associada com a contaminação do ar de interior de edifícios, a *Legionella pneumophila*. Seu habitat pode ser fontes luminosas, chuveiros, jacuzzis, umidificadores, e outros equipamentos de água, incluindo água potável de residências. Está implicada em pneumonias com consequências graves e por vezes, fatal, e tem merecido especial destaque nos principais meios de comunicação da Europa e outras partes do Mundo (FRANCO, 1999).

Dentro de ambas bibliotecas do Dominio Bacteria, ainda foram encontradaa seqüências similares ao gênero *Stenotrophomonas* (Família *Pseudomonadaceae*), um gênero de bactérias Gram-negativas. Possui espécies que são comuns no solo (*S. nitritireducens*) e até espécies que são agentes patogênicos oportunistas em seres humanos (*S. maltophilia*) (PELLERONI, 1993).

Para avaliar a relação entre a abundância dos grupos microbianos e as condições de fertilidade do solo, Smit *et al.* (2001) compararam seus resultados com dados de seqüências do 16S rRNA da literatura. Os resultados mostraram que em solos com alto teor de nutrientes como matéria orgânica, há uma seleção

positiva de bactérias das divisões *Alpha* e *Gamma*, pois são bactérias que apresentam altas taxas de crescimento. No entanto, nos solos com baixo teor de nutrientes a porcentagem de *Acidobacterium* foi alta, apresentando bactérias com baixo potencial de crescimento. Por esses resultados Smit *et al.* (2001) sugeriram que a razão entre *Proteobacteria* e *Acidobacteria* serve como um indicativo da condição nutricional do solo. Nesse trabalho, os Filos *Acidobacteria* e *Proteobacteria* sendo as divisões *Gamma* e *Alpha* se mostraram mais abundantes nas duas bibliotecas.

Filo Firmicutes

O Filo Firmicutes foi muito representado nesse trabalho e encontrado em ambas as bibliotecas, TPBact 7% e TABact 3%. É composto por bactérias, sendo que a maioria possui a parede celular de uma Gram-positiva, mas algumas delas (micoplasmas) sem de paredes celulares, não sendo coradas pela Técnica de Gram. Além disso, falta a elas uma segunda membrana encontrada na maioria das bactérias Gram-negativas. Outras bactérias desse Filo, tais como *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* e *Zymophilus* possuem uma pseudomembrana exterior porosa que as torna Gram-negativas.

Este táxon foi criado originalmente para incluir todas as bactérias Gram-positivas, porém recentemente foi restringida a um grupo-base com formas relacionadas como descrito em bactérias Gram-positivas, aeróbias e com baixo teor de G+C. Os microrganismos desse Filo apresentam metabolismo caracterizado por homo e heterofermentação, além da respiração (LEY *et al.*, 2006),

Microrganismos pertencentes a esse Filo, como os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* são bactérias formadoras de esporos e frequentemente encontrados

nos solos (CANHOS, 1997) e utilizam como estratégia de sobrevivência um crescimento rápido quando há nutrientes disponíveis. Somente prevalecem em condições com grande quantidade de nutrientes e em áreas com baixa competição, geralmente são encontrados em ambientes instáveis que estejam passando por transições (ATLAS, 1997; BARTHA, 1997). Foram encontradas seqüências das seguintes espécies: *Geobacillus therdenificans* - encontrado principalmente em ambientes quentes e em reservas de petróleo; *Bacillus thuringiensis* - é encontrado nos mais diferentes ambientes e facilmente isolado (BLANC *et al.*, 1997; NAZINA *et al.*, 2001); *Bacillus silvestris* isolado de solos de florestas da Alemanha, cultivado em altas temperaturas e alta salinidade (HOLGE *et al.*, 1999).

Entre estas espécies, o mais representativo nas duas bibliotecas (8% TPBact e 3% TABact) foi *Geobacillus termodenitrificans*, que já foi isolado de solos, e é uma bactéria termófila, anaeróbica, degradadora de nitrogênio (EZEJI, 2005).

Filo *Nitrospira*

O Filo *Nitrospira*, segundo Garrity (2001) possui apenas uma Família, engloba bactérias aeróbicas Gram-negativas atuantes no ciclo de nitrogênio em ambientes aquáticos através da oxidação de nitrato. Porém, indivíduos desse grupo têm sido encontrados em amostras de solo (GU *et al.*, 2004). Acredita-se que a atividade deste Filo em ambientes aquáticos possa ter atividades semelhantes em amostras de solo (FAORO, 2006).

Representantes desse Filo foi encontrada em ambas as bibliotecas, TPBact 1% e TABact 8%, sendo classificado no gênero *Nitrospira*, o qual desempenha importante papel no ciclo do nitrogênio, realizando a oxidação de nitrito a nitrato. Segundo Kin e Kin (2006), em ambientes de concentração elevada de nitrito, o

gênero *Nitrobacter* é o mais abundante enquanto que em ambientes com baixa concentração de nitrito, o gênero mais abundante é o *Nitrospira*.

Filo *Verrucomicrobia*

Esse Filo foi proposto por Hedlund *et al.* (1997) e há alguns gêneros de microrganismos cultivados, incluindo *Verrucomicrobium spinosum*, *Prostheco bacter* spp., isolados de água doce, linhagens de ultramicrobactérias (organismos com aproximadamente $0,1 \mu\text{m}^3$ em volume) e isoladas de solo (JANSSEN *et al.*, 1997).

Estudos de seqüências ambientais indicam que *Verrucomicrobia*, assim como os microrganismos *Acidobacterium*, são abundantes e amplamente distribuídos na natureza, particularmente em solos. Estimativas para alguns representantes deste grupo (linhagem EA25 da subdivisão 2 de *Verrucomicrobia*) pela PCR, são da ordem de 10^7 a 10^8 células por grama de solo, aproximadamente 1 a 10% da contagem microbiana total (LEE *et al.*, 1996).

Os microrganismos do Filo *Verrucomicrobia* são bactérias Gram-negativas sensíveis à penicilina (HEDLUND *et al.*, 1997), e representantes foram relatados em ambientes marinhos e amostras de solo (HUGENHOLTZ *et al.*, 1998).

No presente estudo, foram encontradas seqüências dessas bactérias numa frequência de 2% TPBact e 1% na TABact, e Esses dados corroboram com as pesquisas realizadas por Cannavan (2008) e Kim *et al.* (2007).

Filo *Actinobacteria*

Pertencem a esse Filo, as bactérias Gram-positivas e com alto teor de G+C, conhecidas como actinomicetos ou actinobactérias. Essas bactérias têm organização filamentosa, muitas vezes ramificada, e dada sua semelhança com

fungos e por produzirem cadeias de esporos semelhantes a conídios, os Actinomicetos são com frequência erroneamente classificados como tais (STACKEBRANDT *et al.*, 1997).

Os Actinomicetos ocorrem amplamente no solo, mas também podem estar distribuídos em ecossistemas aquáticos e terrestres (CHUN *et al.*, 2000), e em nosso trabalho não ocorre diferente, pois a frequência foi alta na biblioteca TPBact (5%) e na TABact (4%), quando comparado aos outros grupos. As bactérias deste grupo possuem importante função na decomposição da matéria orgânica e formação de húmus (GOODFELLOW, 1983), e por isso, são fundamentais para o melhoramento do solo, e muitos são os representantes, como *Streptomyces griseus* e *Streptomyces aureofaciens*. Uma das características deste grupo, é a produção de mais de 80 antibiótico como a estreptomicina, sintetizada por *S. griseus*; clorotetraciclina, sintetizada por *S. aureofaciens*; a terramicina, sintetizada por *S. rimosus*; entre muitos outros.

Filo Gemmatimonadetes

Nesse trabalho, representantes desse Filo foram encontrados apenas na biblioteca TABact (1%), nenhum na TPBact. Esse filo possui apenas uma espécie isolada, a *Geommatimonas aurantiaca*, bactéria Gram-negativa, aeróbia e mesofílica, encontrada em lama de um sistema de tratamento de esgoto (ZHANG *et al.*, 2003). Porém, ela também pode ocorrer em diversos ambientes, como lodos industriais, sedimentos marinhos e solos (NUNES, 2006).

Filo *Chloroflexi*

As bactérias desse Filo foram descritas numa frequência de 3% na biblioteca de TPBact e 1% na TABact. São também conhecidas como bactérias verdes não-sulfurosas, grupo constituído por organismos com amplo espectro fenotípico, incluindo representantes cultivados com metabolismo fototrófico anóxico (*Chloroflexus* spp.) e organotrófico termófilo (*Herpetosiphon aurantiacus*, *Sphaerobacter thermophilus* e *Thermomicrobium roseum*). Espécies de *Chloroflexus* são metabolicamente versáteis, pois podem também se desenvolver no escuro, como organismos quimiorganotróficos, sob condições aeróbias. A diversidade metabólica desses organismos e a ocorrência de organismos não-cultivados em diversos habitats, incluindo aquíferos, ambientes geotermiais e marinhos, sedimentos e solo, sugerem que esses organismos possam ter um papel ecológico importante nesses ambientes, porém ainda desconhecido (SEKIGUGHI *et al.*, 2003; HUGENHOLTZ, 2004).

Filo *Planctomycetes*

Planctomycetes são bactérias aeróbias, encontradas em ambientes aquáticos, apresenta apenas uma Família (*Plancomycetaceae*, Ordem *Plancomucetales*, Classe *Plancomycetaceae*) e vários gêneros de importância ambiental. Um genoma completo de *Plancomycetes* (*Rhodopirellula báltica*) já foi seqüenciado (GLOCKNER *et al.*, 2003), embora encontrado em baixa frequência (TABact 1%), este grupo é considerado abundante em ambientes terrestres e marinhos (GLOCKNER *et al.*, 2003), e seus representantes participam de importantes processos biogeoquímicos dos ciclos do C e N.

Esses microrganismos não apresentam peptidoglicano na parede celular, característica divergente daquelas dos microrganismos do Domínio Bacteria e outras características envolvendo organização celular e composição de ácidos graxos dos fosfolípidos da parede celular. As células encontram-se, muitas vezes, aderidas à superfície de substratos pelo auxílio de estruturas celulares externas características, tais como: hastes, hifas ou apêndices citoplasmáticos. Além disso, alguns podem apresentar reprodução por brotamento (GLOCKNER *et al.*, 2003).

Esses microrganismos podem representar um ancestral dos atuais metanogênicos do Domínio *Archaea* e tendo um papel importante e central nas transformações do metano (CHISTOSERDOVA *et al.*, 2004).

Estimativa de riqueza e índice de diversidade

A estimativa do valor máximo de OTUs em um nível filogenético pode ser feita utilizando-se métodos estatísticos capazes de extrapolar a relação de OTUs em função do número de seqüências a partir da curva de rarefação ou de métodos não-paramétricos. Nesse trabalho, a riqueza de filotipos foi verificada pelo método de rarefação ao nível de 97% de similaridade e pelos métodos não-paramétricos de estimativa ACE e CHAO1. As curvas de rarefação resultantes foram ascendentes para ambas as bibliotecas, porém não atingiu um platô. (Figuras 07 e 08). Esses resultados mostram que o número de seqüências do gene 16S rRNA para o Domínio não foi o suficiente para mostrar a riqueza destas comunidades, ou talvez pelo fato de que a maioria das seqüências serem somente classificadas a nível de Filo, pelos dois bancos de dados, BLAST/NCBI e RDP-II, porém as duas curvas se mostram relativamente parecidas, sendo que na Biblioteca houve uma leve diferenciação a partir de 100 seqüências analisadas.

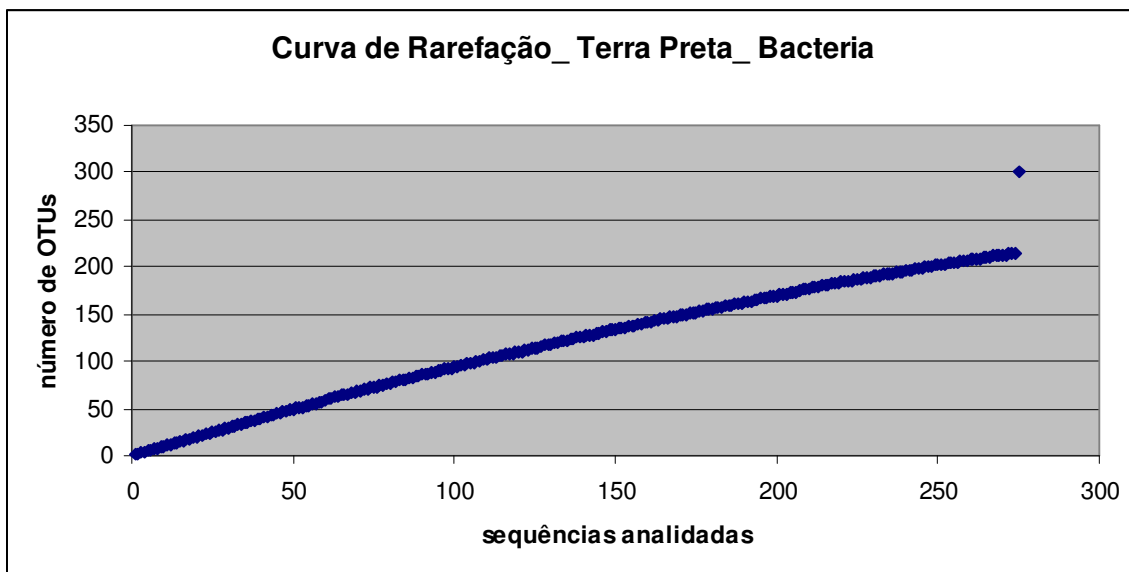


Figura 07 - Curva de rarefação gerada do gene 16S rRNA da biblioteca TPBact

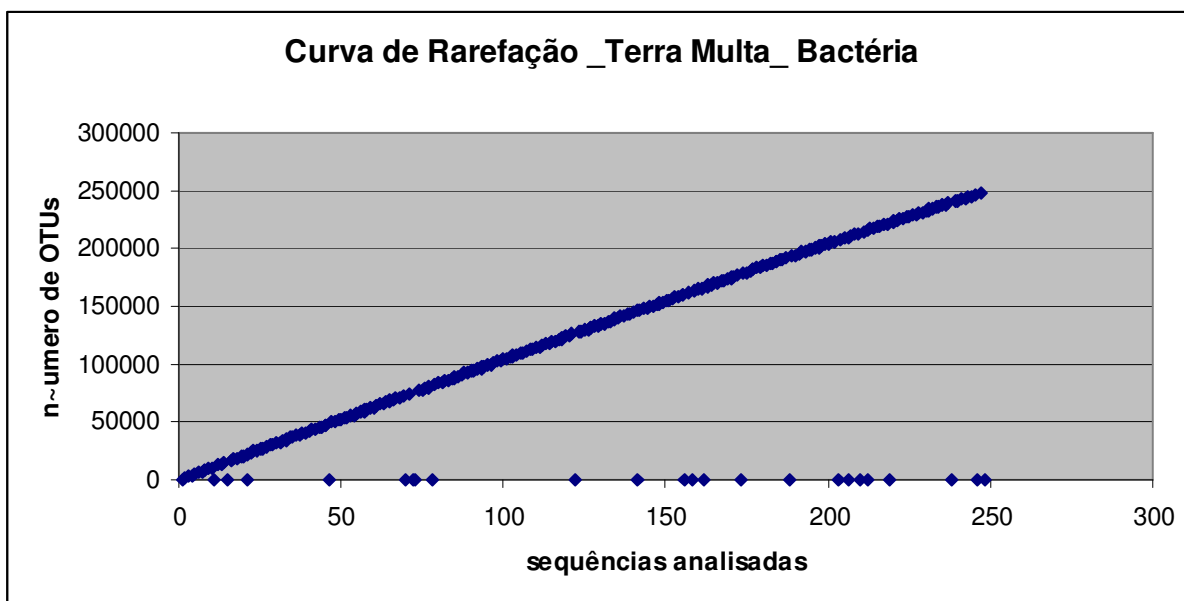


Figura 08 - Curva de rarefação gerada do gene 16S rRNA da biblioteca TPArch

Tabela 5 - Estimativas de riquezas de OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) e índices de diversidade calculados a partir da bibliotecas de 16S rRNA do Domínios Bacteria dos solos de Terra Preta de Índio e Terra Mulata

<i>Biblioteca</i>	ACE	Chao I	<i>Jackknife</i>	<i>Bootstrap</i>	Simpson	Shannon
TPBact	629,4	429,4	436,6	156,5	0,0259	4,286
TABact	248,1	257,6	284,5	167,3	0,0102	4,608

Os cálculos da estimativa de riqueza de espécies pelos métodos não-paramétricos de ACE e Chao1, mostram uma diferença entre as bibliotecas. Estimativas de riqueza baseadas em Chao 1 utilizam o número de espécies que ocorrem uma ou poucas vezes, para estimar o número de espécies desconhecidas. A informação de espécies desconhecidas é principalmente concentrada em espécies de baixa frequência (CHAO, 1984; SHEN; CHAO; LIN, 2003; CHAO; SHEN; HWANG, 2006). Enquanto o estimador baseado na cobertura de abundância (ACE) separa as espécies observadas em grupos de espécies raras e abundantes, e somente utiliza o grupo de espécies raras para estimar o número de espécies desconhecidas (CHAO; LEE, 1992; CHAO; MA; YANG, 1993).

O número de espécies detectadas em uma amostra, ou o número de organismos identificados dentro de um dado nível taxonômico, é fortemente afetado pelo número de seqüências analisadas (JASEN, 2006; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2006). A utilização de bibliotecas de clones 16S rRNA pode não representar totalmente as comunidades microbianas dos solos, pelo fato dos bancos de dados ainda serem limitados, e pela dificuldade da taxonomia dos procaríotos ainda não ser totalmente definida (CURY, 2006). Ainda, estimativas de riqueza de espécies bacterianas em solos apontam para uma diversidade elevada, aumentando a necessidade de um maior esforço amostral para uma completa caracterização desta

diversidade (CURTIS; SLOAN; SCANNELL, 2002; ROESCH et al 2007; TORSVIK: GOKSOYR: DAAE, 1990).

Os valores obtidos com o índice de diversidade de Simpson revelaram maior diversidade de OTUs na biblioteca construída com o solo de Terra Preta de Índio (TPBact) ao comparar com os valores obtidos nas bibliotecas TABact (Tabela 5). Já os resultados para o índice de Shannon mostraram um índice elevado para as bibliotecas construídas com o solo de Terra Mulata ou Adjacente (TABact).

Os valores obtidos pelos índices de Simpson e Shannon para a biblioteca do Domínio Bacteria de Terra Preta e Mulata, corroboram com o trabalho realizado por KIM *et al.* (2007), que encontraram uma maior diversidade ao utilizarem os índices de Simpson (0,015) e Shannon (5,2) em solos de Terra Preta. Esses índices empregam independentes aproximações matemáticas para medida de diversidade. O índice de Shannon considera a riqueza ou números diferentes de espécies encontradas em diferentes áreas, considerando ainda, a equitabilidade ou igualdade da distribuição de indivíduos, o que torna uma boa medida representativa da diversidade de um solo (MAGURRAN, 1988; ODUM, 1983; PINTO-COELHO, 2000). Desta maneira, o índice evidencia o peso das espécies raras ou de baixa frequência encontradas em cada área. Espécies não dominantes e espécies raras podem em alguns casos, exercer uma força controladora no ecossistema, com papéis chaves na funcionalidade do mesmo (PINTO-COELHO, 2000). Para o índice de Simpson, o cálculo dá maior peso as espécies mais abundantes, e a adição das espécies raras praticamente não causam mudanças significativas no valor encontrado para o mesmo (MARGURRAN, 1988; ODUM, 1983; PINTO-COELHO, 2000).

As estimativas realizadas pelo Bootstrap, foram similares aos valores de diversidade obtidos pelos índices de Simpson e Shannon, pois tal relação encontra-

se no fato deste estimador basear-se em sub-amostragens do conjunto de OTUs utilizado para o cálculo destas medidas de diversidade das bibliotecas. O estimador Jackknife de riqueza de OTUs revelou uma relação diferente, onde a biblioteca provenientes da Terra Preta de Índio (TPBact) se mostra mais elevada. Uma explicação pode ser pelo fato deste resultado mostrar apenas as OTUs únicas presentes para o cálculo empregado pelo Jackknife. Uma maior probabilidade de ocorrência de OTUs únicas empregadas pelo estimador de Jackknife é revelada pela maior freqüência de filotipos nas bibliotecas de Terra Preta.

Análises Filogenéticas.

Devido aos altos índices de seqüências de organismos não cultivados e/ou não classificados nos solos estudados, nesse trabalho, foram feitas análises filogenéticas utilizando o programa MEGA 4.0. Tais análises não tinham como objetivo realizar a classificação filogenética e evolutiva dos microrganismos, mas apenas auxiliar o agrupamento das seqüências ditas não-classificadas em relação aos Filos que possam pertencer ou se aproximar filogeneticamente. Esse tipo de informação de sequenciamento da subunidade 16S rRNA não é suficiente para caracterizar as comunidades de microrganismos desconhecidos em nível de gênero ou espécie, precisa-se de mais informações sobre análises fisiológicas e morfológicas pelo cultivo em meio de cultura (GARRITY *et al.*, 2004), entretanto, essa classificação possibilitou observar diferenças entre as comunidades.

Para estas análises, o modelo de árvore filogenética foi de neighbor-joining, no qual a árvore com a menor soma total de ramos é procurada (CAVALLI-SFORZA e EDWARDS, 1967; SAITOU e IMANISHI, 1989). Baseada sob uma perspectiva probabilística em um modelo de evolução, e escolhe o caminho “menos tortuoso”, ou seja, aquele que necessita de um menor número de pressupostos. Seu princípio fundamental está na idéia de que os eventos de substituições independentes, gerando condições finais iguais devem ser vistos como menos prováveis e, portanto, devem ser minimizados (JIN e NEI, 1990; NEI *et al.*, 2000).

A árvore filogenética pertencente à biblioteca TPbact, mostrou uma divisão em 04 Clusters principais, onde os filios descritos se separam nitidamente, houveram cluster onde somente as amostras nomeadas pelos bancos de dados se agrupam entre si, mas sempre próximo ao clado irmão de um dos filios. Já na árvore filogenética da biblioteca TABact, mostrou uma divisão em 5 clusters principais.

Onde também os filos ficaram nitidamente separados. Em ambas as análises com inferência do bootstrap, mostrou-se um alto índice de confiança.

Essa relação mostra a intenção de tentar inserir os organismos não classificados, pois somente com o sequenciamento completo do gene 16S rRNA, ou do seu genoma completo, além de análises de Microbiologia Clássica que envolve o isolamento, e testes bioquímicos, é que se pode descrever Esses indivíduos como sendo organismos de uma nova espécie. Para uma melhor inferência, foi usada uma seqüência do domínio Archaea como grupo externo (Figuras 09,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19)

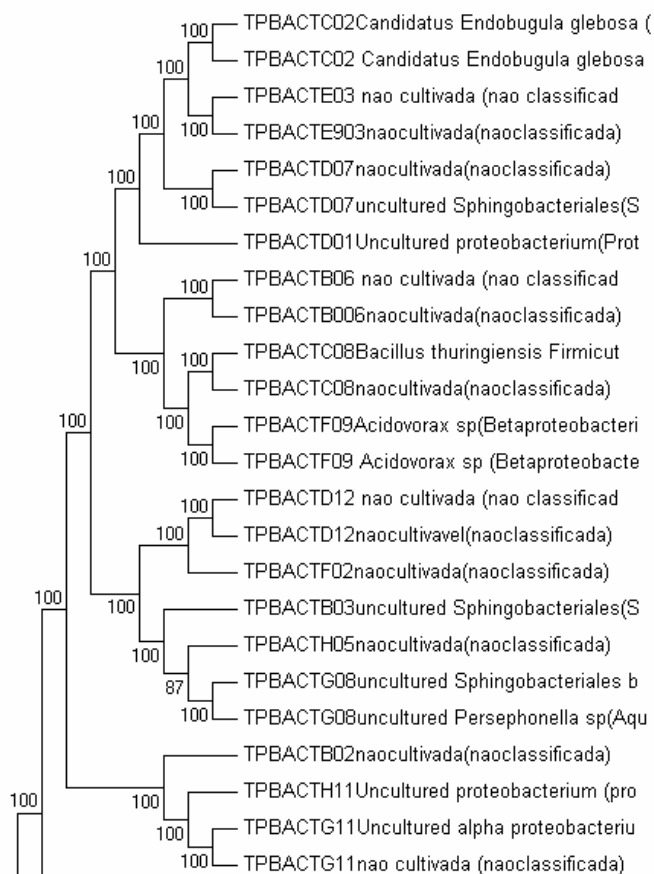


Figura 09 - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencentes ao Filo *Aquificales*, *Sphigobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Gammaproteobacteria* obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Preta de Índio. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 réplicas.

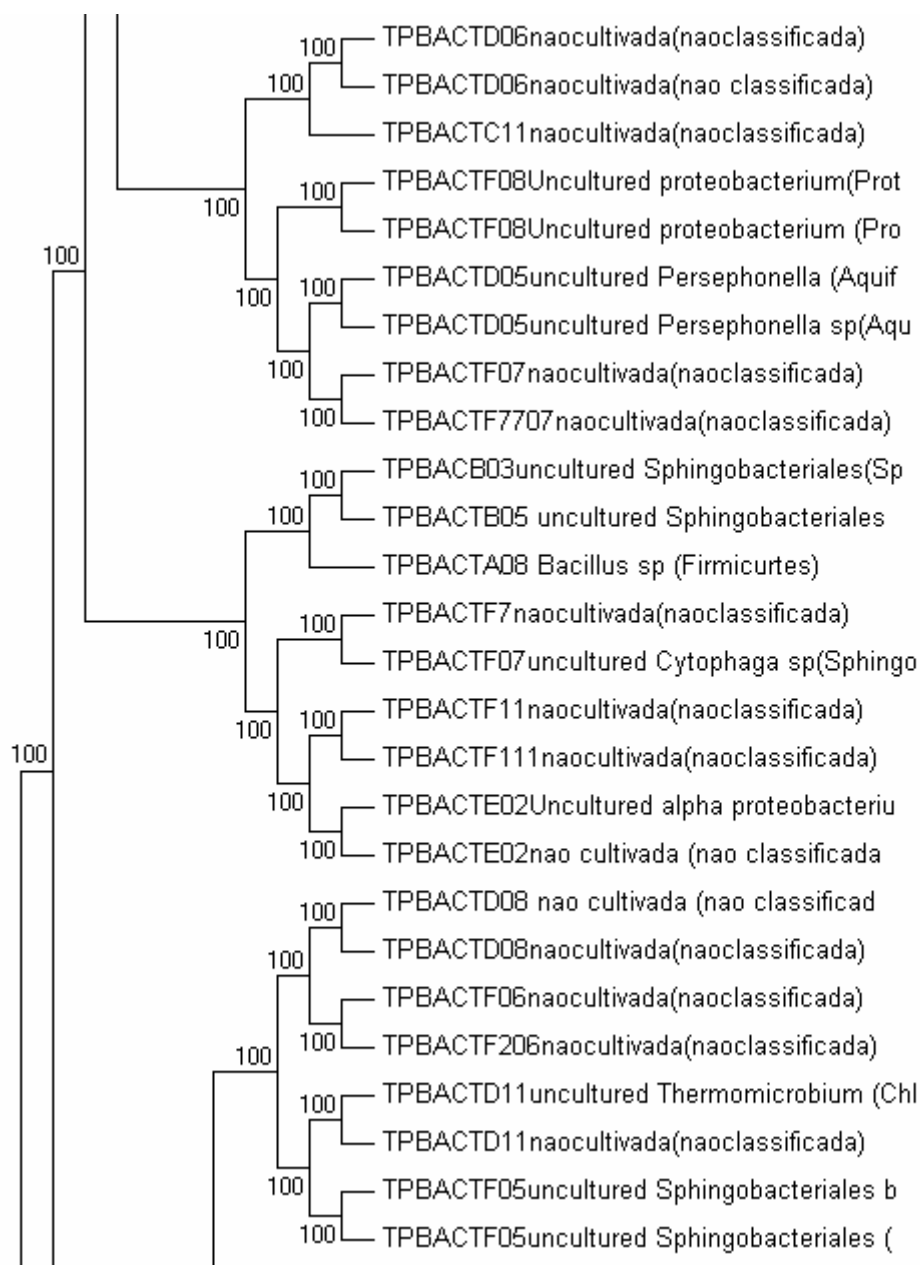


Figura 10 - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes ao Filo *Aquificales*, *Alphaproteobacteria*, *Sphigobacteria*, *Cloroflexi*, *Firmicutes*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') so solo de Terra Preta de Índio. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritimo “Jukes Cantor” e “Neighbor-Joing” com “bootstrap” de 1000 replicas.

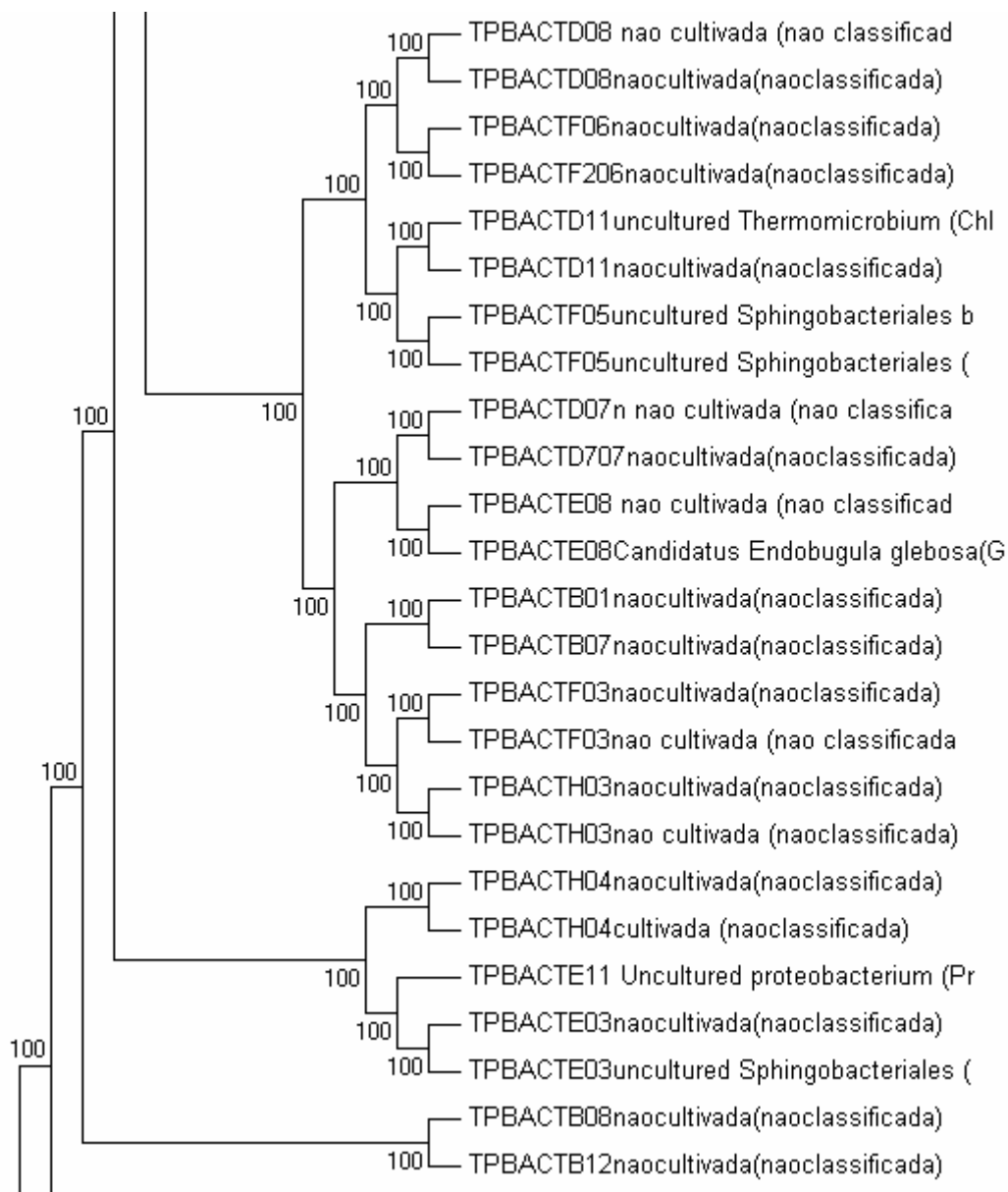


Figura 11 - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Gammaproteobacteria*, *Proteobacteria*, *Sphigobacteria*. obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') so solo de Terra Preta de Índio. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joing" com "bootstrap" de 1000 replicas.

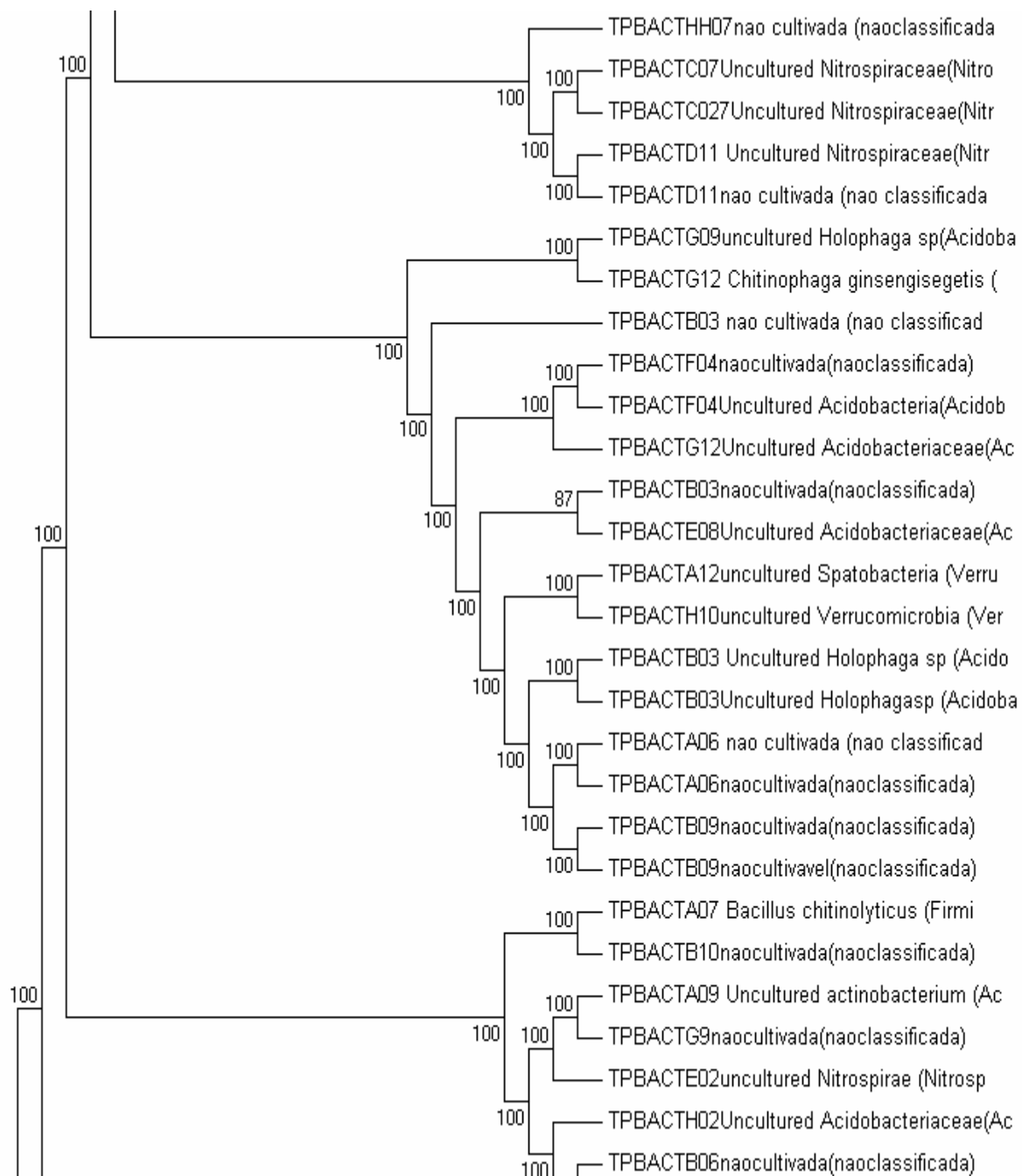


Figura 12 - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos Acidobacteria, Nitrospira, Verrucomicrobia. Obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') so solo de Terra Preta de Índio. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritimo “Jukes Cantor” e “Neighbor-Joining” com “bootstrap” de 1000 replicas.

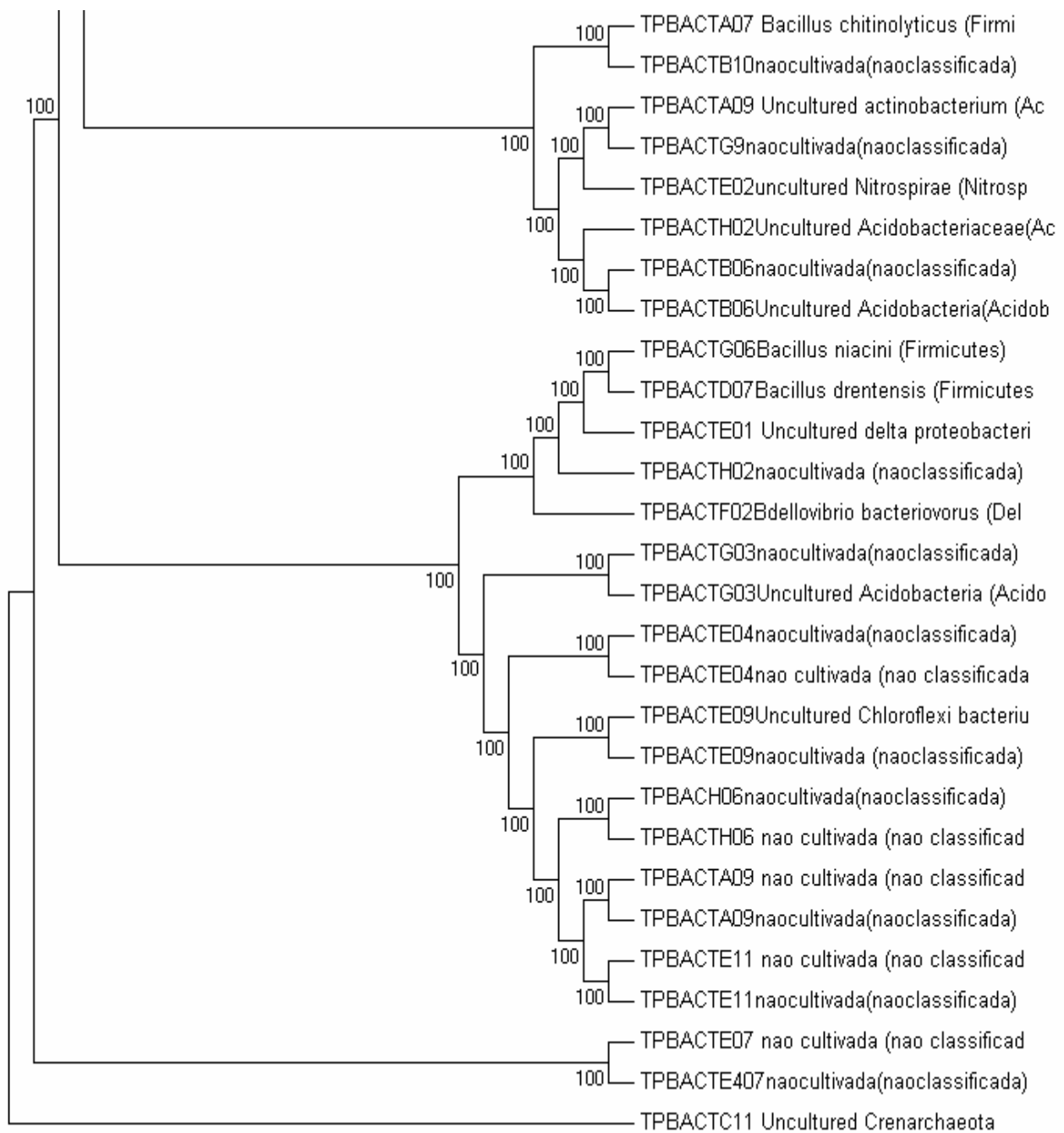


Figura 13 - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Cloroflexi*, *Acidobacteria*, *Nitrospira*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Deltaproteobacteria* Obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') so solo de Terra Preta de Índio. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 replicas. Com grupo externo do Domínio Archaea.

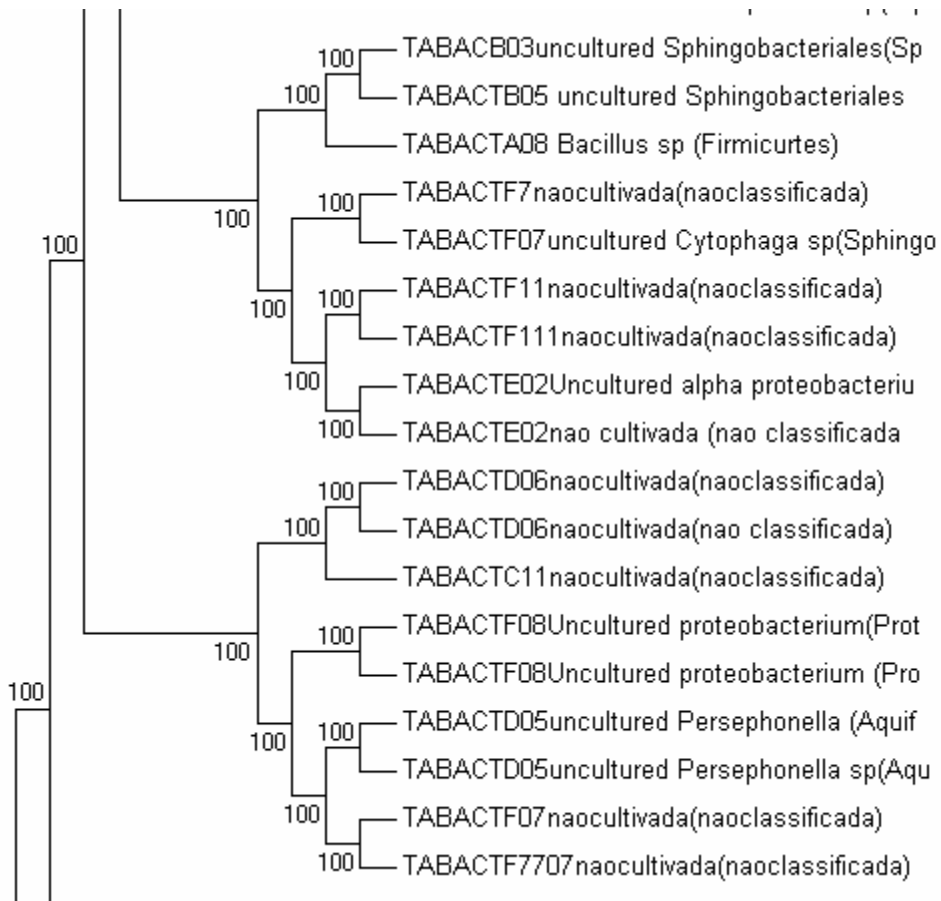


Figura 15 - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Proteobacteria*, *Proteobacteria*, *Sphigobacteria* e *Aquificales*. obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Mulata. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo “Jukes Cantor” e “Neighbor-Joing” com “bootstrap” de 1000 replicas.

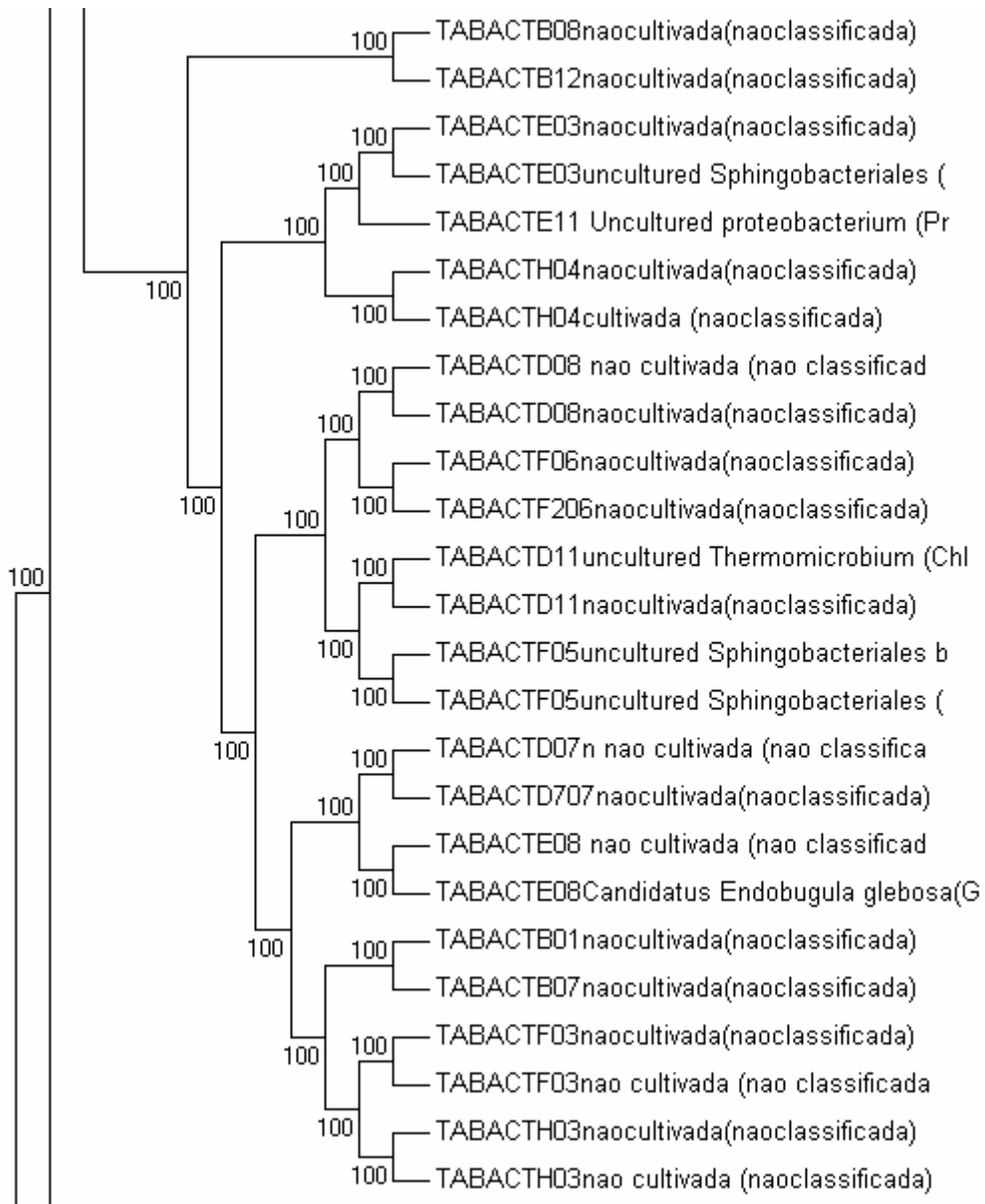


Figura 16 - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Gammaproteobacteria*, *Cloroflexi*. Obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') so solo de Terra Mulata. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 replicas.

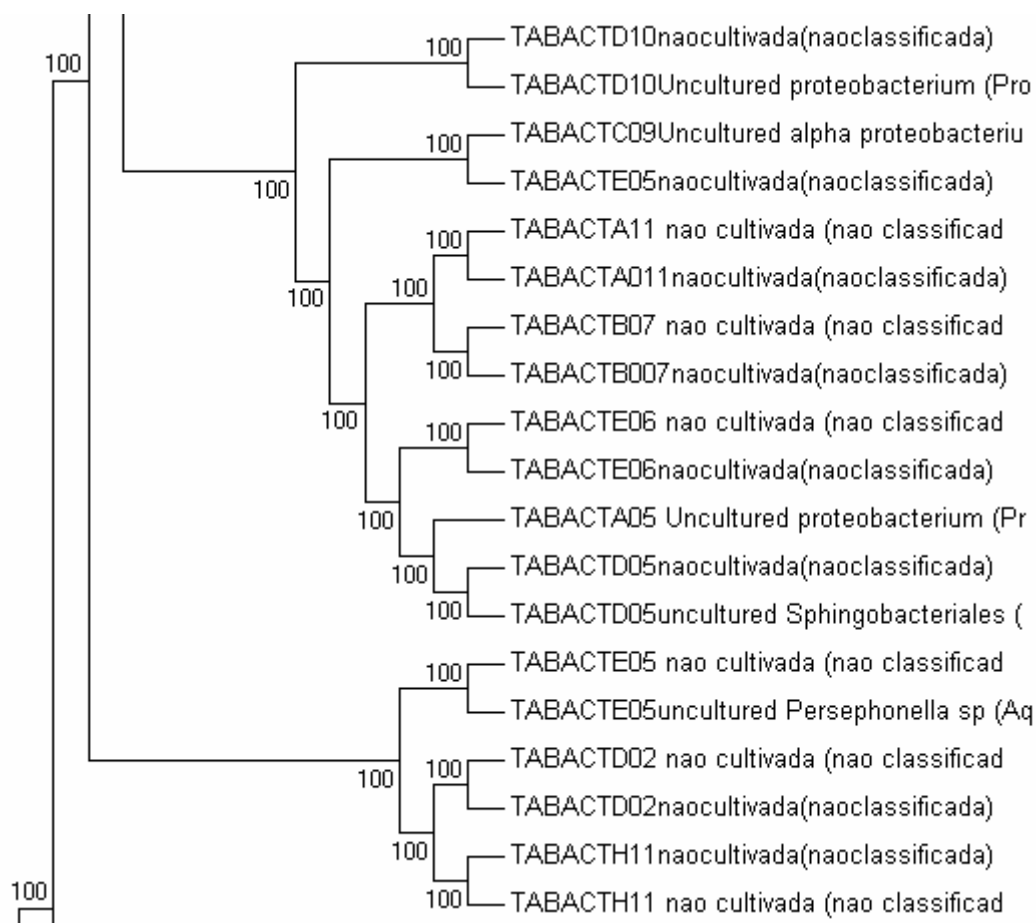


Figura 17 - Dendograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Proteobacteria*, *Sphigobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Aquificales*, *Alphaproteobacteria*. Obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Mulata. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 replicas.

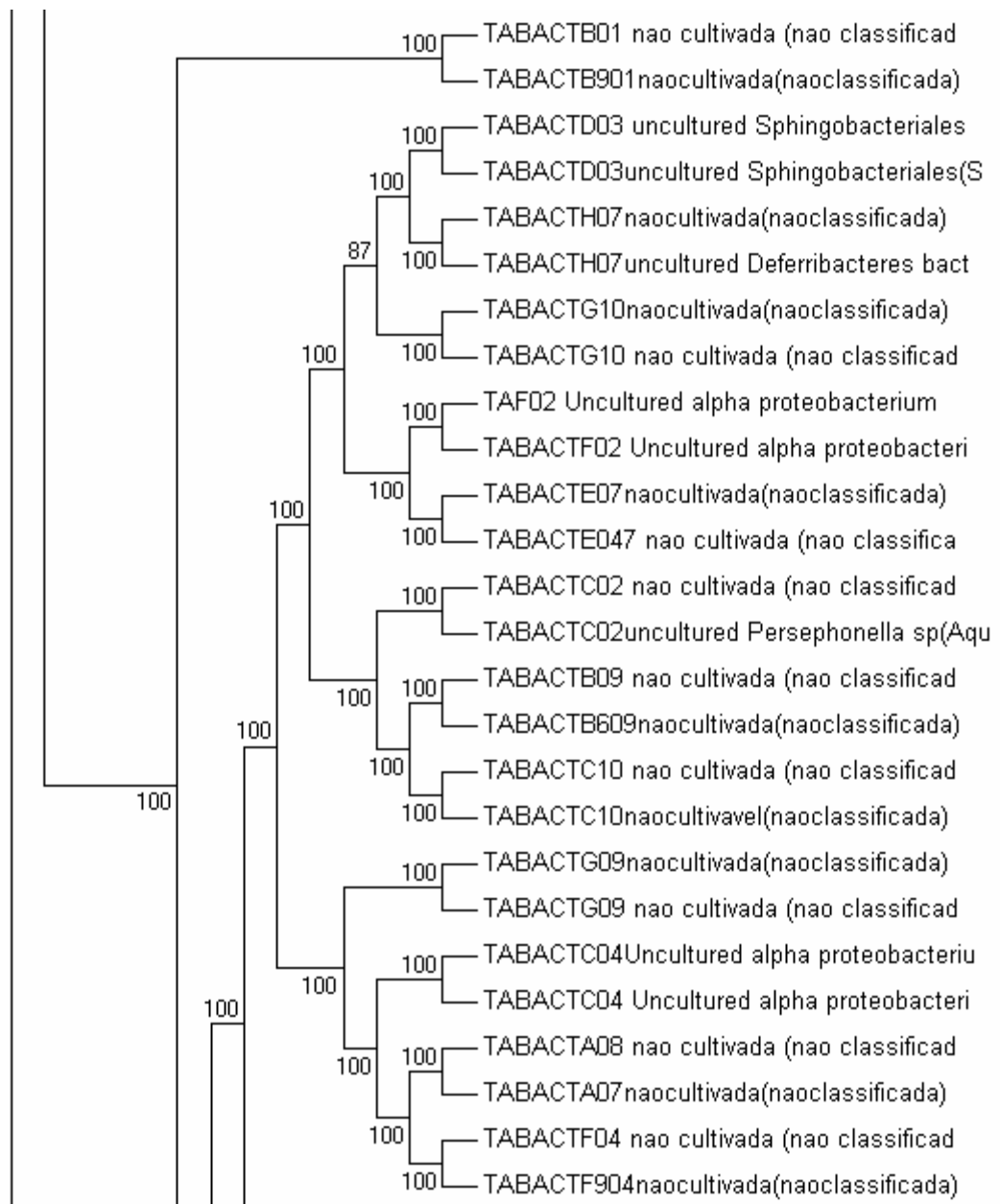


Figura 18 - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Proteobacteria*, *Sphigobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Aquificales*. Obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') so solo de Terra Mulata. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo “Jukes Cantor” e “Neighbor-Joing” com “bootstrap” de 1000 replicas.

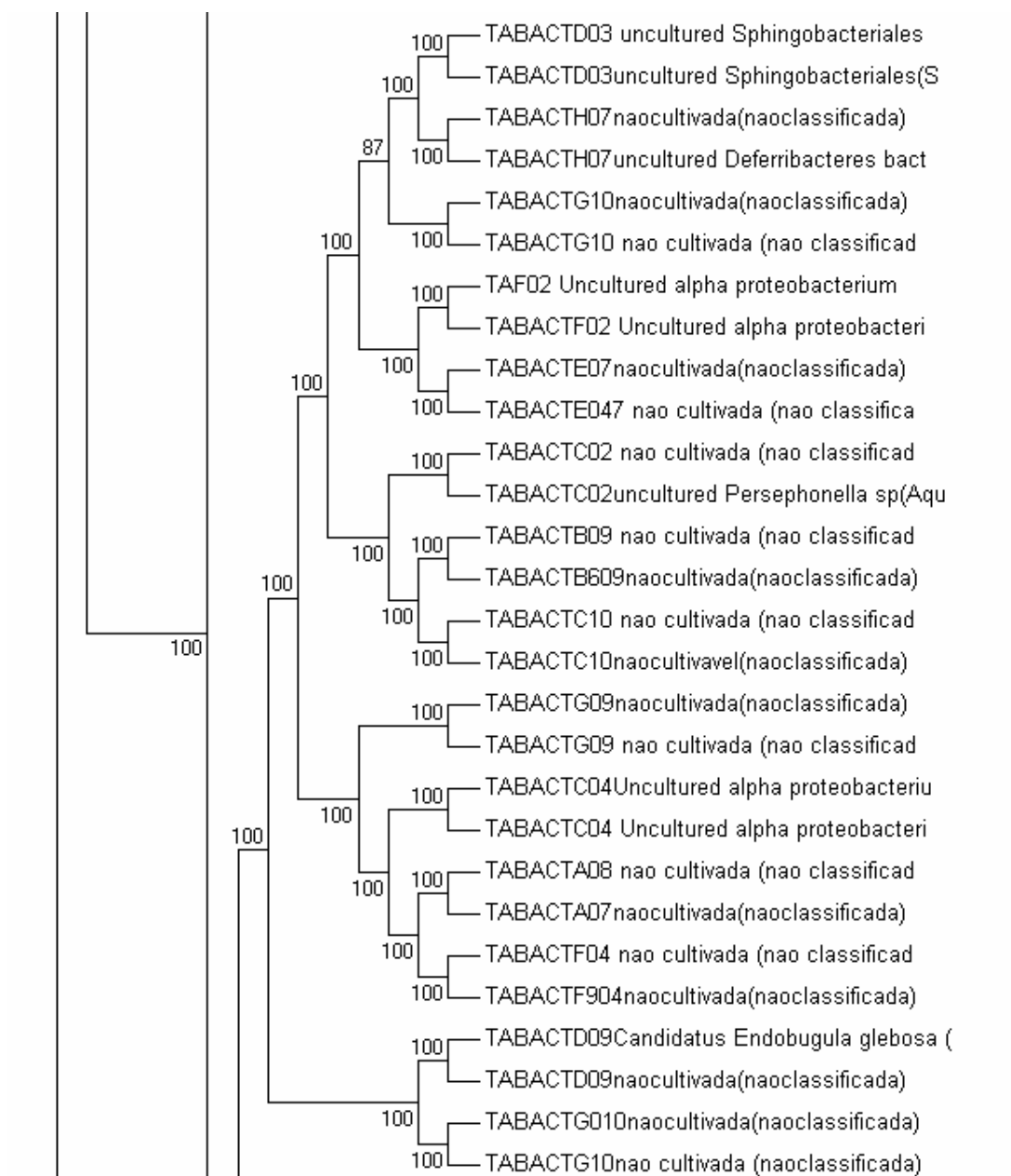


Figura 19 - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Proteobacteria*, *Sphigobacteria*, *Gammaptoteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Aquificales*. Obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') so solo de Terra Mulata. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo “Jukes Cantor” e “Neighbor-Joining” com “bootstrap” de 1000 replicas.

CONCLUSÕES

Com a construção de bibliotecas de clones 16S rRNA a partir de solos e posterior análise comparativa das seqüências usando os bancos de dados do NCBI (BLAST) e RDP-II, determinou-se a estrutura das comunidades bacterianas prevalentes nas amostras dos solos, que possibilitou a identificação dos filos predominantes, sendo que os microrganismos desconhecidos e ou não-cultivados representam 38% das seqüências em TPBact e 58% em TABact.

O Filo mais predominante nos dois solos pesquisados nesse trabalho foi o da *Acidobacteria*, representando 20% do total de seqüências na TPBact e 11% na TABact.

Os outros Filos encontrados na biblioteca TPBact onde se destacam: *Nitrospira* e *Firmicutes*, com freqüência de 8% e 7%, respectivamente; *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* e *Proteobacteria* (5%); *Cloroflexi* (3%); *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Sphigobacteria* e *Verrucomicrobia* (2%).

Na biblioteca TABact, os Filos em destaque foram: *Sphigobacteria* com freqüência de 5%;, *Actinobacteria* *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* (4%), *Betaproteobacteria* e *Firmicutes* (3%); *Aquaficae* e *Proteobacteria* (2%); e por fim, *Nitrospira* 1%.

Destaca-se o Filo Actinobacteria, que foi encontrada em ambas as bibliotecas, possuem um grande potencial biotecnológico, pois o gênero *Streptomyces* é um

grande produtor de antibióticos. Já foram produzidos mais de 80 tipos de antibióticos a partir desse gênero, sendo o principal a estreptomicina.

A estimativa da riqueza de OTUs pelo Bootstrap corrobora diretamente com os valores de diversidade obtidos pelos índices de Simpson e Shannon. De um modo geral, uma maior probabilidade de ocorrência de OTUs únicas empregadas pelo estimador Jackknife se correlacionou com uma maior frequência de baixos percentuais de filotipos nas bibliotecas. Os valores obtidos com os métodos não-paramétricos ACE e Chao1 para a estimativa da riqueza de OTUs corroboram com os valores obtidos com o estimador Jackknife.

Um desafio é a entender a relação entre a diversidade dos microrganismos do solo, com a sustentabilidade da fertilidade do solo e a produção agrícola, e os efeitos ambientais, como emissão de gases de efeito estufa e seqüestro de carbono, bem como, com o ciclo de nitrogênio e as bactérias denitrificantes.

REFÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ATLAS, M.; BARTHA, R. 1998. Microbial ecology: Historical development. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial ecology. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, p 2-26a.
- ATLAS, M.; BARTHA, R. 1998 Microbial evolution and Biodiversity. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial ecology. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, p 27-57
- ATLAS, M.; BARTHA, R. 1998 Microorganisms in their natural habitats: air, water, and soil microbiology. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial ecology. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, p 333-337c
- BARNS, S.M.; CAIN, E.C.; SOMMERVILLE, L.; KUSKE, C.R. 2007. Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, v.73, n.09, p. 3113-3116.
- BELL, S. D., BOTTING, C. H., WARDLEWORTH, B. N., JACKSON, S. P. & WHITE, M. F. 2003 The interaction of Alba, a conserved archaeal chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. Science 296, 148–151.
- CANHOS, V. P. et al Diversidade do Domínio Bactéria, In: CANHOS, V.P. et al. Biodiversidade do Estado de São Paulo: Síntese do conhecimento ao final do século XX. São Paulo: FAPESP, p. 1-13, 1997.
- CHAO, A. LEE, S.M. 1992. Estimating the number of classes via simple coverage. Journal of the American Statistical Association, Alexandria, v. 87, p. 210-217.
- CHAO, A.; MA, M-A.; YANG, M.C.K. 1993 Stopping rule and estimation for recapture debugging with unequal detection rates. Biometrika, London, v.80, p. 193-201.
- CHO, J.; GIOVANNONI, S.J. 2003. *Robiginitalea biformata* gen. Nov., sp. Nov., a marine bacterium that forms a deep evolutionary lineage of descent in the order 'Rhizobiales'. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Berks, v. 53. p. 1857-1859.
- CHROMAS 2.13 URL: (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). Consultado em 10 de fevereiro de 2003.
- CHISTOSERDOVA, L., JENKINS, C., KALYUZHNYAYA, M. G., MARX, C. J., LAPIDUS, A., VORHOLT, J. A., STALEY, J. T. & LIDSTROM, M. E. 2004 The enigmatic planctomycetes may hold a key to the origins of methanogenesis and methylotrophy. Mol. Biol. Evol. 21, 1234–1241.

- CHUN, J., A. HUQ, AND R.R. COLWELL. 2000. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibriomimicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2202-2208.
- CRUMP BC, ARMBRUST EV, BAROSS JA. 1999 Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl Environ Microbiol* 65:3192–3204
- CURY, J.C. 2006. Diversidade de Bactéria e Archaea em solos de mangue e marisma. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição e Plantas) Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- CURTIS, T.P.; SLOAN, W.W.; SCANNELL, J.W. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A*, Washington, v. 99, p. 10494-99.
- DADIDOV, Y.; JURKEVITCH, E. 2004. Diversity and evolution of Bdellovibrio-and-like organisms (BALOs), reclassification of *Bacteriovorax starrii* as *Peredibacter starrii* gen. nov., comb. Mov., and description of the *Bacteriovorax-Peredibacter* clade as *Bacteriovoraxaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*, Berks. v. 54, p. 1439-1452.
- DUNBAR, J. et AL 2002. Empirical and theoretical diversity in four Arizona soils. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 68, n 06, p. 3035-45.
- EZEJI, T.C., AND BAHL, H. 2005. Purification, characterisation, and synergistic action of phytate-resistant α -amylase and α -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10. Submitted.
- FELSKE, A.; WOLTERINK, A.; van LIS, R.; AKKERMANS, A. D. L. 1998. Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in a Drentse grassland soils (The Netherlands). *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 54, p. 871–879.
- FREITAG, T.E., AND PROSSER, J.I. 2004. Differences between betaproteobacterial ammonia-oxidizing communities in marine sediments and those in overlying water. *Appl Environ Microbiol* 70: 3789–3793.
- GARRITY, G. M., AND J. G. HOLT. 2001. The road map to the *Manual*, p. 119–166. In D. R. Boone and R. W. Castenholz (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1: the *Archaea* and the deeply branching and phototrophic *Bacteria*. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURUN, T.G. 2004. Taxonomic outline of prokaryotes. In: Taxonomic outline of prokaryotic genera *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. 2 ed. New York: SpringerVerlag, New York, Inc,
- GIOVANNONI, S. J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:369-394.

- GOOGFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T. 1983 Ecology of actinomycetes. Annual Review of microbiology. Palo Alto, v. 37, p. 189- 216.
- GREEN, R.N., TROWBRIDGE, R.L., KLINKA, K., 1996. Towards a taxonomic classification of humus forms. Forest Sci. Monogr. 29, 49.
- GU, A. Z.; HEDLUND, B.P.; STALEY, J.T.; STRAND, S.E.; STENSEL, H.D. 2004. Analysis structure of two enrichment cultures capable of reductively dechlorinating TCE and cis-DCE. Environmental Microbiology, Oxford, v. 6, p. 45-54.
- HACKL, E.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; BODROSSY, L.; SESSITSCH, A. 2004. Comparison of diversities and composition of bacterial populations inhabiting natural forest soils. Applied and Environmental Microbiology. Baltimore, v.70, n. 9, p. 5057-65.
- HALL, T. A. 1999. *BioEdit*: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98.
- HANDELSMAN J, RONDON MR, BRADY SF, CLARDY J, GOODMAN RM 1998 Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chemistry and Biology 5:R245-249.
- HIRAISHI, A.; KISHIMOTO, N.; KOSAKO, Y.; WAKAO, N.; TANO, T. 1995 Phylogenetic position of the menaquinone-containing acidophilic chemoorganotroph *Acidobacterium capsulatum*. FEMS Microbiology Letters, v. 132, p. 91-94.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.*, v. 180, p. 4765-4774.
- JANSSEN, H. P.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L.; STACKEBRANDT, E. 1997. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. *In*: Modern Soil Microbiology. VAN ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. Marcel Dekker, Inc. New York, 712p,.
- JANSSEN, P.H., 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology 72, 719–1728.
- JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. *In*: MUNRO, H.N. Mammalian protein metabolism. New York: Academic press. Chap 24, v. 3, p. 21-137.

- JURKEVITCH, E. 2000. The genus *Bdellovibrio*. In *The Prokaryotes*. Dworkin, M., Rosenberg, E., Schleifer K.H., and Stackebrandt, E. (eds). New York, NY, USA: Springer-Verlag. URL <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>.
- JURKEVITCH, E., AND RAMATI, B. (2000) Design and uses of a *Bdellovibrio* 16S rRNA-targeted oligonucleotide. *FEMS Microbiol Lett* 184: 265–271.
- JURKEVITCH, E., MINZ, D., RAMATI, B., AND BAREL, G. 2004. Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66: 2365–2371.
- KANDLER, O. The early diversification of life. Nobel Symposia, 84: 152-160. 1994..
- KIM, J.S.; SPAROVEK, G.; LONGO, R.M.; De MELO, W.J.; CROWLEY, D. 2007. Bacteria diversity of Terra preta of pristine forest soil from the western Amazon. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 39, p. 684-690.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 4 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm09
- LEE, S.Y. 1996. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3787-93.
- LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. Estimativas de biodiversidade brasileira. In: LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I, 2002. (Ed). *Biodiversidade Brasileira: Síntese do estado atual do conhecimento*, Estado de São Paulo. p.91.
- LEY, R. E., TURNBAUGH, P. J., KLEIN, S. & GORDON, J. I. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023
- LIESACK, W., F. BAK, J.-U. KREFT, AND E. STACKEBRANDT. 1994. *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. *Arch. Microbiol.* 162:85–90.
- MAIDAK, B. L., J. R. COLE, C. T. PARKER, G. M. GARRITY, N. LARSEN, B. LI, T. G. LILBURN, M. J. MCCAUGHEY, G. J. OLSEN, R. OVERBEEK, S. PRAMANIK, T. M. SCHMIDT, J. M. TIEDJE, AND C. R. WOESE. 1999. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 27:171–173.
- MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K.V.; GOUD, S.J. Reino Bactéria (Prokaryote, Procarutar, Monera). In: MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K.V.; GOUD, S.J Um guia ilustrados dos filós da vida na Terra. 3 ed. New York. p.39-106. 1998
- MAGURRAN, A.E. 1988. Ecological diversity and its measurement. New Jersey: Princeton,. 179p.

- MITSUI, H.; GORLACH, K.; LEE, H. J.; HATTORI, R.; HATTORI, T. 1997. Incubation time and media requirements of culturable bacteria from different phylogenetic groups. *J. Microbiol. Methods*, v. 30, p. 103-110.
- NEI, M. E KUMAR, S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University press, New York.
- NUNES, G.L. 2006. Diversidade e estrutura de comunidade de Bacteria e Archea em solo de mangue contaminado com hidrocarboneto do petróleo. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- PACE, N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276: 734-740. mistry, Baltimore, v.256, p. 4718-4721.
- PAABO, S.; IRWIN, D.M.; WILSON, A.C. 1992. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *Journal of Biological Chemistry*
- PALLERONI, N.J. 1993 *Pseudomonas* classification: A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek; Journal of Microbiology and Serology*, Delft, v.64, p.231-251.
- QUAISER, A. 2003. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Mol. Microbiol.* 50, 563–575
- RAPPÉ, M.S.; GIOVANNONI, S.J. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 369–94 2003.
- SAITOU, N.; NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*, Chicago, v.4, p. 406-25.
- SHEN, T.J., CHAO, A., LIN, C.F., 2003. Predicting the number of new species in further taxonomic sampling. *Ecology* 84, 798–804.
- SHEN, J., LIU, X., WANG, S., AND RYO, M. (2006) Paleoclimate changes in the Qinghai Lake area during the last 18 000 years. *Quatern Int* **136**: 131–140.
- SCHLEGEL, H.G. & JANNASCH, H.W. 1992. Prokaryotes and their habitats. In: Ballows, A., Truper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W. & Schleifer, K.-H. (eds.). *The prokaryotes*. Vol. I. New York: Springer Verlag. p. 75-125.
- SCHLOSS, P; LARGET, B. R; HANDELSMAN, J. 2004 Integration of microbial ecology and statistic: a test to compare gene libraries. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 70, n. 9, p 5485-5992.
- SMIT, et al. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in wheat fields as determined by cultivation and molecular. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington, v.67, p. 2284-91.

- STACKEBRANDT E, RAINEY FA (1997) Partial and complete 16S rDNA sequences, their use in generation of 16S rDNA phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies. In: Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ (eds) *Molecular Microbiology and Ecology Manual* 3.1.1. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1–17
- SKJEMSTAD, J.O.; CLARKE, P.; TAYLOR, J.A.; OADES. J.M.; MCCLURE, S. G. The chemistry and nature of protected in soil. *Australian Journal of Soil Research*, v. 34. p. 251-271, 1996.
- TORSVIK, V.; ØVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion In Microbiology*, v. 5, p. 240-245, 2002.
- WARS, B.B. 2003. How many species of prokaryotes are there. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* Washington, v. 99, n. 16, p. 10234 – 236.
- WANG, C.C.Y.; WANG, C.C.Y.; 1997. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacteria species. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v. 63, p. 4645-50.
- WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E. & HOLT, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume 4: Actinomycetes. Baltimore: Williams & Wilkins, Co.(eds.). 1989
- WOESE CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 51 (2):221-71. Review, 1987.
- WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87** (12): 4576–9. 1990.
- WOESE C. The universal ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95** (12): 6854–9, 1998.
- YABUUCHI. E. et al. , 1997 *Burkholderia uboniae* sp. nov., L-arabinose-assimilating but different from *Burkholderia thailandensis* and *Burkholderia vietnamiensis*. *Microbiol. Immunol.* 44, 307–317
- ZUCKERKANDL, E.; PAULING. L. Molecules as documents of evolutionary history. *J.Theor Biol*, v. 8, p. 357-366, 1965.

CAPÍTULO 2

Diversidade do Domínio *Archaea* do solo de Terra Preta de Índio e Terra Mulata da Amazônia Ocidental.

Batista-Silva, L., Spartaco Astolfi Filho, Luciana Leomil

INTRODUÇÃO

Uma importante parte da vida na Terra foi descrita cerca de 30 anos atrás, vinda de ambientes muito extremos de pH, temperatura, pressão e salinidade, sendo terrestres ou aquáticos (ROTHSCHILD e MANCINELLI, 2001). A partir de 1990, as arqueias foram inseridas na árvore da vida através de estudos com genes ribossomais, além de proteínas estruturais, sendo então classificadas como um terceiro Domínio (WOESE *et al.*, 1990). Entre os três grandes Domínios da vida, os membros do Domínio *Archaea* são os menos compreendidos em termos da sua diversidade, fisiologia, genética e ecologia. Ele se encontra dividido em três Filos, *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* e *Korarchaeota*, e estão presentes em vários ambientes naturais (Figura 01) (BARNES *et al.*, 1996; BANO *et al.*, 2004).

As arqueias não são apenas diferentes por residirem em lugares extremos, mas por existirem de forma abundante, principalmente em ambientes marinhos, como as profundezas dos oceanos. Sua predominância no plâncton marinho aponta para um elemento crucial e ainda pouco conhecido no papel dos ciclos biogeoquímicos do Planeta (KARNER *et al.*, 2001; LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2001). Além disso, incluem microrganismos capazes de realizar a metanogênese (produção de metano a partir de H₂ e CO₂), e por esta razão, se tornaram o objeto central de estudos da Paleobiologia (SCHLEPER *et al.*, 2005).

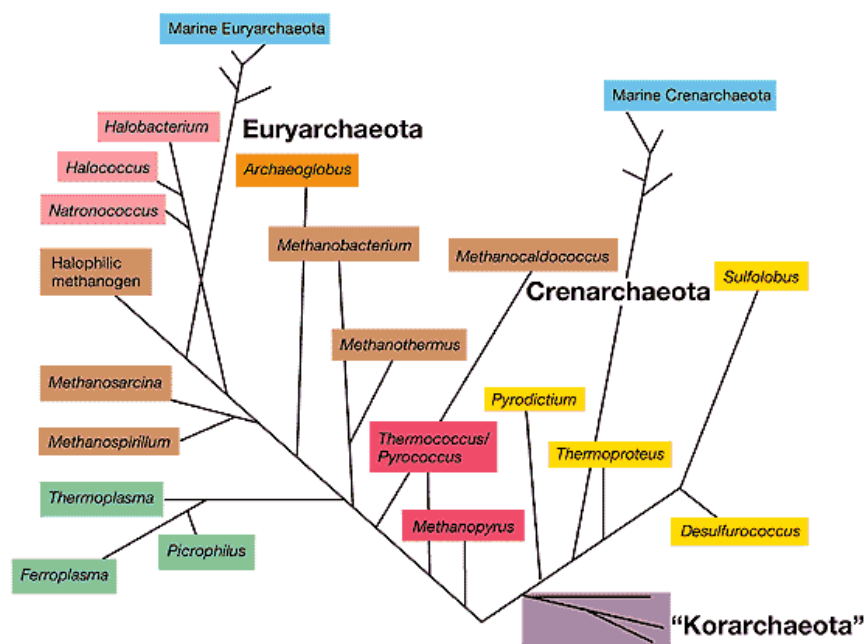


Figura 01 - Árvore filogenética do Domínio Archaea, dividida em 3 Filos: Euryarchaeota, Crenarchaeota e Korarchaeota. Este último ainda não possui representantes isolados, apenas seqüências genéticas do gene 16S rRNA (adaptado de Madigan *et al.*, 2003 - Brock Biology of Microorganisms)

O Domínio *Archaea* possui as formas de vida mais antigas, e fósseis foram datados em cerca de 3,5 milhões de anos (BROCKS *et al.*, 1999). Além disso, foram encontrados traços de lipídeos detectados desde a Era Pré-cambriana, com cerca de 2,7 milhões de anos, que até então, foi descrito somente em eucariotos (CHAPPE *et al.*, 1982). Os traços mais antigos desses lípidos (isoprenos) têm origem no distrito de Isua, na Groelândia ocidental, que inclui sedimentos formados há mais de 3,8 milhões de anos e que são os mais antigos na Terra (HAHN, 1986).

A ampla semelhança entre os Domínios (*Archaea*, *Eucarya* e *Bacteria*) vem sendo demonstrada através de estudos genéticos, porém cada um tem suas estruturas e funções próprias que não são compartilhadas. O Domínio *Archaea* possui semelhanças entre os outros dois Domínios, com o *Eucarya*, mantém traços ancestrais, enquanto se derivou bastante do Domínio *Bacteria*. É possível que o último ancestral comum das bactérias e das arqueias seja um termófilo, o que

levanta a possibilidade de que as temperaturas menores são "ambientes extremos" para as arqueias, e microrganismos que vivem em ambientes mais frios, apareceram mais tarde na Terra (WOESE, 1998; FORTERRE e PHILIPPE, 1999; GRIBALDO e PHILIPPE, 2002).

Gupta (1998) propõe um modelo, onde os Domínios *Archaea* e *Eukarya* podem ser considerados como do Domínio *Bacteria* modificada, e prevê a possibilidade de que membros de um Domínio possam dar origem a outro Domínio. Isto exige especificamente que ocorra um episódio de evolução acelerada no ramo do Domínio ou no ancestral em comum (GUPTA 1998; CAVALIER-SMITH, 2002).

A relação entre os Domínios *Archaea* e *Eucarya* é um problema importante, pois ainda não se encontrou uma ramificação bem resolvida, isto ocorre, pois muitas árvores genéticas aproximam os dois grupos quanto as semelhanças na estrutura celular e função. Algumas análises sugerem uma maior relação entre o Domínio *Eucarya* e o Filo *Euryarchaeota*, do que ocorre entre esse Filo e o Filo *Crenarchaeota* (LAKE, 1988). No entanto, YUTIN (2008) acredita que genes de arqueias descritos em eucariotos, sejam a prova de que esses Domínios tenham um ancestral comum, e isto pode ter ocorrido por transferência horizontal de arqueias dos Filos *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota* para um hipotético ancestral de eucarioto.

A descoberta de genes parecidos com os de arqueias, em certas bactérias como *Thermotoga maritima*, torna estas relações difíceis de determinar, uma vez que a transferência horizontal de genes ocorre a todo momento entre os microrganismos (NELSON *et al.*, 1999).

Estudos de filogenia molecular vêm mostrando que as populações ambientais de arqueias são diversas e complexas, e freqüentemente, apresentam espécies ainda não identificadas e/ou não-cultivadas, pois é difícil de cultivá-las diretamente

dos ambientes. Contudo, o conhecimento das características filogenéticas das comunidades de arqueias presentes em um ambiente natural, pode fornecer informações importantes sobre as funções fisiológicas e de seu papel ecológico (TAKAI *et al.*, 2001).

Como Esses microrganismos foram primeiramente isolados de ambientes extremos, por muito tempo não foram considerados importantes para a ecologia de comunidades de diferentes ambientes (BINTRIM *et al.*, 1997), mas o interesse pela ecologia dEsses organismos começou a aumentar a partir do isolamento de arqueias nos mais diversos ambientes, como o ambiente marinho (DeLONG, 1992; MASSANA *et al.*, 1997), solos (MATSUGUCHI, 1995; TREUSCH *et al.*, 2004) e sedimentos de água doce (MacGREGOR *et al.*, 1997). Embora Esses organismos sejam muito estudados, existem apenas 32 genomas completamente seqüenciados do Domínio Archaea, um número bem inferior ao Domínio Bacteria, com 554 genomas completos

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

Foram realizadas duas coletas de solo de Terras Pretas de Índios e de solo adjacente, no Município de Presidente Figueiredo (Amazônia Ocidental) no Estado do Amazonas. A primeira coleta foi realizada na comunidade Rumo Certo a 187 Km de Manaus (Figura 2). As coordenadas geográficas da área de coleta para o solo de Terra Preta de Índio (TPI) são 02° 01' 52,5" S - 059° 26' 28,3" W, e da área da Terra Mulata são 02° 01' 56,1" S - 059° 26' 24,2" W. O clima da região é Tropical, sendo quente e úmido, com temperaturas médias entre 25°C e 35°C. A vegetação é

formada por Floresta Tropical, com terras acidentadas com Planície, Vertente e Baixio.

Coleta e Preparo das Amostras de Solo

O solo foi coletado de cada sítio na posição horizontal com tubos policloreto de vinila (PVC) de 5 cm de diâmetro (limpos com Etanol 70%), nas profundidades de 0 - 10; 10 - 20; 20 - 30; 30 - 40 e 40 - 50 cm (Figura 3). De cada profundidade, foram retiradas quatro amostras de solo com os tubos de PVC. Essas amostras foram acondicionadas em sacos plásticos de polietileno em caixas de isopor com gelo seco, para manter sua umidade durante o transporte e, posteriormente, foram armazenadas em temperatura a 4 °C (duas amostras de PVC) e a -20 °C (outras duas amostras). No laboratório, as amostras foram separadas em sub-amostras para a extração do DNA e para análises físico-químicas.

Análise do material para avaliar teores de macro e micro nutrientes

As determinações analíticas das amostras de solo foram efetuadas no Laboratório do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) na Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba (SP) sob supervisão da Profa. Dra. Siu Mui Tsai. As amostras do solo foram analisadas para pH, Cobre, Zinco, Manganês, Ferro, Boro, Fósforo, Potássio, Cálcio, Magnésio, Alumínio, Hidrogênio, Enxofre, Antimônio.

Análises Físicas do Solo – Granulometria

A separação dos sólidos de um solo, em diversas frações é o objetivo do peneiramento. Este processo é adotado para partículas (sólidos) com diâmetros

maiores que 0,075mm. Este processo divide-se em peneiramento grosso, partículas maiores que 2 mm e peneiramento fino, partículas menores que 2mm.

Para o peneiramento de um material granular, a amostra é, inicialmente, secada em estufa e seu peso determinado. Esta amostra será colocada na peneira de maior abertura da série previamente escolhida e levada a um vibrador de peneiras onde permanecerá pelo tempo necessário à separação das frações.

Após a secagem em estufa, as amostras foram colocadas em placa de petri, coloca-se 10 mL de peróxido de hidrogênio para eliminar a matéria orgânica, pois a matéria orgânica se liga aos outros materiais e pode alterar o teor de argila. Tampou-se com vidro de relógio. Ficou overnight. Foi colocada então 10 mL de dispersante, que ficou por 24 horas, este dispersante serve para separar as partículas de areia, argila e silte. Após essa etapa, as amostras são colocadas em provetas de 1 litro onde as amostras ficaram decantando. Cada amostra foi colocada em um agitador por 15 min com água destilada. Após a agitação, as amostras foram peneiradas em uma peneira de 0,053, onde será separada a argila, silte e areia. A areia vai para um aplaca de petri e colocada em estufa a 105 C por 24 hrs. O restante do material foi para uma proveta de 1000 mL em temperatura ambiente. Esse matéria ficou 24 hrs decantando. Após essa etapa as amostras forma pesadas.

Extração e Quantificação de DNA genômico de solo

Do material coletado, aproximadamente 0,5 g do solo homogeneizado foi transferido para microtubos de 1,5 mL para extração de DNA genômico. A extração do DNA foi realizada utilizando o protocolo de extração e orientações do fabricante do kit de extração comercial “Ultra Clean Soil DNA Purification Kit” (USA - MOBIO® - Catálogo 12800-50). Após a extração de DNA, foi realizada a sua quantificação pela corrida de eletroforese em gel de agarose na concentração 0,8% a 80 Volts, corado

com brometo de etídeo (10 mg/mL) e as amostras foram visualizadas em transiluminador em luz ultravioleta.

Amplificação do gene 16S rRNA pela PCR

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada através do protocolo da reação da PCR, como descrito em CRUMP *et al.* (1999), com modificações, e consiste de um volume final de 25 µL (25 mM MgCl₂; 2,5 mM DNTPs; 5 pmol/µL de cada iniciador; 1,25 U/µL de *Taq* DNA polimerase; Tampão 10X). Os iniciadores universais para o gene 16S rRNA utilizados nesse trabalho estão descritos a seguir:

Domínio *Archaea*: (DELONG, 1992)

- 21 f (5' - TTC YGG TTG ATC CYG CCR GA - 3')
- 958 r (5' - YCC GGG TTA NTC CAA TT - 3')

O perfil térmico da PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação por 2 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos, como se segue: desnaturação de fitas-molde por 40 segundos a 94°C, pareamento dos iniciadores por 30 segundos a 58°C, e extensão por 1 minuto a 72°C. E um ciclo final de extensão por 5 minutos a 72°C. Em seguida, foi realizada uma corrida das amostras pela eletroforese em gel de agarose na concentração 0,8% a 80 Volts, corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) e visualizado em transiluminador em luz ultravioleta.

Clonagem do gene 16S rRNA

Purificação dos Produtos da PCR

Os produtos da PCR foram purificados antes da ligação do vetor de clonagem utilizando-se o Kit “GFX PCR - DNA and Gel Band Purification KIT” (Amersham Biosciences® - Catálogo 27-9602-01), seguindo as recomendações do fabricante.

Esta metodologia consistiu em colocar uma coluna de GFX em um “tubo de coleta” para cada purificação realizada; e acrescentou 100 µL de tampão de captura ao produto da PCR e transferiu essa solução à coluna GFX. O mesmo foi centrifugado a 13.400 rpm por 30 segundos, sendo a fase líquida descartada, e em seguida, foi adicionado 200 µL do tampão de lavagem à coluna, que foi centrifugado a 13.400 rpm por 30 segundos; novamente o líquido do tubo de coleta foi descartado e a coluna GFX foi transferida para um microtubo novo de 1,5 mL (microtubo comum); e o DNA foi eluído em 50 µL do tampão de eluição (DDH₂O estéril) diretamente sobre a matriz na coluna GFX.

Sistema de Ligação

O sistema de ligação foi realizado utilizando o Kit “TOPO TA Cloning for Sequencing” (Invitrogen) como segue: 10 ng/mL do vetor; 4,0 µL do produto da PCR purificado; 1,0 µL da solução de sal diluído, tendo 10 µL como volume final. Em seguida, a reação foi misturada gentilmente e foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, sendo depois armazenada a -20 °C

Transformação genética

A transformação seguiu o procedimento de acordo com o fabricante do Kit “Transforming One Shot Mach - T1 Competent Cells” (Invitrogen). Do sistema de ligação, 2 µL foi adicionado a 50 µL da célula competente, que foram eletroporadas a 1.900 Volts. Após a eletroporação, 1 mL de meio SOC (coloca a q significa) foi colocada na cubeta para eletroporação para a recuperação do sistema + vetor. Essas células foram incubadas sob agitação por 1 hora a 37 °C, sendo em seguida, semeadas em placas de meio Luria-Bertani (LB) com Ampicilina (200 µg/mL). As

placas semeadas foram incubadas durante 18 horas a 37°C. As colônias brancas foram transferidas para microplacas de 96 poços contendo 150 µL de LB e ampicilina. Depois foram acrescentados 50 µL de glicerol 50% em cada poço, e congelados a -80°C até a realização das reações de seqüenciamento.

Extração Plasmidial - Mini-prep

As colônias brancas foram coletadas com auxílio de palitos estéreis e transferidas pra microplaca *Deep-Well* com 96 poços, contendo 1,5 mL de meio Circle Grow acrescido com ampicilina (100µg mL⁻¹). A placa foi selada com filme adesivo e cada poço foi perfurado com agulha estéril para a aeração da bactéria. Os clones foram incubados sob agitação orbital (shaker) a 320 rpm, por 22 hrs.

Após o crescimento, foram transferidos 100 µL de células para placa estéril contendo 100 µL de glicerol 50%. A placa foi selada e as células estocadas a -80°C.

A partir das placas armazenadas a -80°C, 240 µL de GET foi acrescentado a cada poço, e agitada por 2 minutos (para ressuspender bem as células). Em seguida, foram centrifugadas a 4.000 rpm durante 9 minutos. As placas ficaram invertidas em papel absorvente por 5 minutos. Foi adicionada mais 80 µL de GET em cada poço, e agitadas por 2 minutos, para ressuspender as células. Depois, foi adicionada em cada poço de uma microplaca 1,5 µL de RNase (10 mg/mL) e 60 ul da suspensão de células foi transferida para a microplaca. Em cada poço, foi adicionado 80 µL de NaOH 0,2N / Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 1%, e as microplacas foram incubadas durante 10 minutos em temperatura ambiente. Depois, foi acrescentado em cada poço 80 µL de KOAc 3M e misturou-se 30 vezes por inversão. Novamente, as microplacas foram incubadas durante 10 minutos em temperatura ambiente, e foram centrifugadas a 4.000 rpm, durante 10 minutos, a 20°C. Previamente, foi fixada com

fita adesiva, uma placa Millipore (MAGV N22) no topo de uma microplaca de fundo em “V”. Todo o volume do sobrenadante (evitando transferir os debris celulares) foi transferido para a placa Millipore e centrifugadas (sem a tampa) a 4.000 rpm, durante 5 minutos e 30 segundos, a 20°C ou até todo o volume descer para a outra placa (fundo em “V”). Após a centrifugação, a placa Millipore foi descartada. Na microplaca de fundo em “V”, foi adicionada 100 µL de Isopropanol (Merck) e centrifugada a 4.000 rpm, durante 45 minutos, a 20°C. Depois foi adicionado 200 µL de Etanol 70% (Merck) gelado, e centrifugada a 4.000 rpm, por 5 minutos, a 20°C. O sobrenadante foi removido e as microplacas foram invertidas sobre papel absorvente e para retirar qualquer resquício de álcool, as mesmas foram centrifugadas a 900 rpm (“pulso”) a 20°C. As placas foram secas durante 1 hora em temperatura ambiente, e cobertas com papel toalha. O DNA foi ressuscendido com 60 µL de DDH₂O, e deixado durante 18 horas a temperatura ambiente.

Seqüenciamento do Gene 16S rRNA

A reação de seqüenciamento consistiu do seguinte protocolo: 4,0 µL do Pré-Mix (“DYEnamic ET Dye Terminador Cycle Sequencing Kit for Mega BACE” - Amersham Biosciences®); 1,0 µL de cada iniciador a concentração de 5,0 pmol/µL; 1,0 µL de DNA molde; 4,0 µL de DDH₂O autoclavada, para um volume final de 10,0 µL. Os iniciadores utilizados foram:

- Domínio Archaea: 21 f (5' - TTC YGG TTG ATC CYG CCR GA - 3')

O perfil térmico da reação de seqüenciamento consistiu de 20 ciclos, como se segue: desnaturação de fitas-molde por 3 minutos a 95°C, pareamento dos iniciadores por 30 segundos a 95°C e extensão por 30 segundos a 60°C. E um ciclo final de extensão por 1 minuto e 20 segundos a 60°C.

Precipitação do produto da reação de sequenciamento de DNA

A precipitação foi realizada após a reação de sequenciamento para eliminar todos os produtos que não foram incorporados. Em cada poço foi colocado 1 µL de acetato de amônio a 7,5 M e 27,5 µL de Etanol 100% que foi homogeneizado e deixado durante 10 minutos em temperatura ambiente e depois, centrifugado a 4.000 rpm por 40 minutos. Após este processo, o sobrenadante foi descartado por inversão, foi adicionado 120 µL de Etanol 70%, e centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão e deixado para secar por 15 minutos em temperatura ambiente, e ressuspensas com "Loading Solution". O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador capilar Mega BACE (Amersham Biosciences®), conforme recomendações do fabricante.

Processamento e Análise das Seqüências

As seqüências obtidas foram processadas para a remoção de vetor e de seqüências de baixa qualidade (índice de qualidade < 20) utilizando-se os programas "PHRED/PHRAP" (GREEN, 1996). As seqüências foram trimadas usando o Programa Cross-Match. Cada seqüência foi comparada com seqüências depositadas no "GenBank®" (NCBI), utilizando-se o Programa de busca avançada "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST - NCBI), para identificação das espécies procarióticas. Após esta comparação, as seqüências foram conferidas, alinhadas e editadas com o auxílio dos programas BioEdit 5.0.9 (HALL 1999) e Chromas 2.23 (<http://www.techenesium.com.au>).

Análises Filogenéticas e Estatísticas.

Para as análises de relações filogenéticas das seqüências de nucleotídeos foi utilizado o programa Análise Genética de Evolução Molecular MEGA 4.0 (KUMAR *et al.*, 2001), pelo método da construção neighbor-joining (SAITOU e NEI, 1987) com algoritmos Jukes-Cantor (JUKES *et al.*, 1969). Os ramos da árvore gerada foi inferida pelo índice de bootstrap com 1000 réplicas em cada nó, onde poderão ser visualizadas as espécies e subespécies proximamente relacionadas.

Para análises estatísticas, foi realizada quanto ao grau de diferenças significativas entres as seqüências nucleotídicas, pela comparação de suas curvas homólogas, pelo programa DOTUR (SCHOLL *et al.*, 2004). Nessa análise, as curvas homólogas das amostras, formadas pela relação entre as distâncias evolutivas e as coberturas de amostragem, foram comparadas, sendo calculadas as diferenças entre os pontos equivalentes da curvas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Coleta e caracterização dos solos

As amostras de solos de Terra Preta de Índio (TPI) e de Terra Mulata (TM ou ADJ) foram coletadas nas profundidades de 5, 10, 20, 30 e 40 cm, porém foram usadas apenas as amostras de solo da 2^o coleta, nas profundidades 10, 20 e 30 cm, por apresentarem maior diversidade bacteriana, conforme descrito por Tsai *et al.* (2003). Após a coleta, foram realizadas as análises químicas e físicas das amostras no Laboratório do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) na Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba (SP), cujo resultados estão descritos abaixo.

Através das análises químicas (Tabela 1) as amostras de TPI mostraram valores baixíssimos de pH quando comparados com os solos de TM, confirmando os valores encontrados por LIMA *et al.* (2002) e por FALCÃO (2006). Foram observados também altos teores de cálcio (Ca) e fósforo (P), porém baixa saturação por alumínio, conforme descrito por KERN (1989) e LEHMANN *et al.* (2002). Outra característica encontrada nos solos de TPI, foi o alto valor da capacidade de troca catiônica (CTC), quando comparados com os solos de TM. Esses valores confirmam a elevada fertilidade desses solos, pois a CTC é muito importante para a retenção de nutrientes e de água, sendo que o valor desta capacidade varia com o teor e a natureza da argila, mas principalmente com o teor de matéria orgânica.

Nas análises físicas (Tabela 2) mostraram que os solos de TPI e TM são diferentes entre si, pois o primeiro possui uma elevada quantidade de silte e argila (o que dificultou a obtenção de DNA mais íntegro, já que o mesmo pode ficar retido por mais tempo no solo), e o segundo demonstrou ter uma grande quantidade de areia.

Tabela 1 - Resultado das análises químicas das amostras de TPI e TM, realizadas na Laboratório do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) na Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba (SP)

Amostra	Cu g/dm ³	Zn g/dm ³	Mn g/dm ³	Fe g/dm ³	B g/dm ³	pH CaCl ₂	MO g/dm ³	P g/dm ³	K g/dm ³	Ca g/dm ³	Mg g/dm ³	Al g/dm ³	H g/dm ³	S g/dm ³	CTC g/dm ³	Sat
TP1 (10)	1,6	1,6	16,8	49	0,52	4,7	55	17	0,6	54	8	2	98	7	160,6	3
TP1 (20)	1,7	1,1	14,4	47	0,43	4,6	50	15	0,6	38	5	4	88	8	131,6	8
TP1 (30)	0,6	0,6	5,6	27	0,34	3,6	25	34	0,1	3	1	19	166	6	170,1	82
ADJ1 (10)	0,2	0,5	7,7	240	0,37	4,4	54	11	1,1	35	9	5	80	7	125,1	10
ADJ1 (20)	-1,0	-1,0	1,0	94	0,40	3,7	23	4	0,3	6	1	16	121	3	128,3	69
ADJ1 (30)	-1,0	-1,0	0,6	56	0,31	3,7	21	2	0,1	2	1	19	109	5	112,1	86
TP2 (10)	0,4	36,4	3,5	29	0,16	4,5	47	65	0,5	25	7	5	80	2	112,5	13
TP2 (20)	0,4	46,4	2,5	26	0,13	4,6	40	59	0,3	24	5	3	80	3	109,3	9
TP2 (30)	0,4	15,2	2,0	27	0,22	4,6	25	29	0,2	19	2	3	52	4	73,2	12
ADJ2 (10)	-1,0	0,9	1,2	153	0,22	3,5	23	8	0,4	1	1	17	80	4	82,4	88
ADJ2 (20)	-1,0	0,2	0,7	36	0,25	3,8	28	2	0,2	1	1	15	98	1	100,2	87
ADJ2 (30)	0,3	13,0	1,9	26	0,22	4,6	23	22	0,2	20	2	3	52	1	74,2	12

Cu: cobre; Zn: zinco; Mn: manganês; Fe: ferro; B: boro; MO: matéria orgânica; P: fósforo; K: potássio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; Al: alumínio; H: hidrogênio; S: sódio; CTC: capacidade de troca catiônica; Sat: saturação

Tabela 2 - Resultados das análises físicas encontrados nas amostras de TPI e TM, pela técnica de granulometria

Amostras	Areia 2.00 - 0.05 mm	Silte 0.05 - 0.002 mm	Argila < 0.002 mm
TP2 10cm	58,88	22,62	18,50
TP2 20cm	53,4	18,10	28,50
TP2 30cm	57,93	13,57	28,50
ADJ2 10cm	83,15	8,35	8,50
ADJ2 20cm	68,68	22,82	8,50
ADJ2 30cm	70,88	8,62	20,50

Extração de DNA genômico total do solo

As extrações de DNA genômico total dos solos foram realizadas com três repetições para cada amostra de solo, TPI e TM (ou TADJ), usando o “Kit Power Soil DNA Isolation” (MOBIO®). O DNA genômico das amostras de solo foi extraído e obtendo uma boa quantidade e qualidade de DNA, como mostrado no gel de agarose a 0,8% (Figura 02 e 03), além disso, foi realizada a quantificação dos DNA por espectrofotômetro (Tabela 3).

Tabela 3 - Quantificação de DNA de cada amostra utilizada nessa pesquisa pela leitura do espectrofotômetro

Amostras	260/280	DNA Ratio	DNA (µg/mL)	<i>Proteína</i>	Resultado Final (ng/ µL)
TP2 (10)	0.077 / 0.052	1.481	2.971	22.39	73.15
TP2 (20)	0.025 / 0.024	1.042	0.709	18.32	23.75
TP2 (30)	0.069 / 0.059	1.169	2.216	39.31	65.55
ADJ2 (10)	0.019 / 0.018	1.056	0.547	13.55	18.05
ADJ2 (20)	0.025 / 0.025	1.000	0.673	19.87	23.75
ADJ2 (30)	0.023 / 0.023	1.000	0.619	18.28	21.85

Amplificação e purificação do gene 16S rRNA

Com o DNA obtido, foram realizadas Reações da Polimerase em Cadeia (PCR) com iniciadores específicos do gene 16S rRNA para os Domínios Archaea. Os produtos da PCR amplificados geraram fragmentos de 940 pb para o Domínio Archaea (Figura 1), gerando assim, produtos suficientes para a realização das clonagens.

Para minimizar a formação de moléculas quiméricas, pois isso é possível quando se utiliza uma mistura de DNA genômico de diferentes espécies com o gene 16S rRNA (WANG e WANG, 1997), foram modificados o número de ciclos da PCR dos trabalhos originais, de 35 para 30 ciclos (Domínio *Archaea*).

As moléculas quiméricas são formadas por mais de uma seqüência de organismos, e quando estas seqüências são comparadas com os bancos de dados, podem ser identificadas como sendo uma nova espécie ou não-classificada, sugerindo assim a presença de um indivíduo ainda não descrito. A principal causa da formação das moléculas quiméricas é a presença de fitas simples de DNA terminadas prematuramente, especialmente nos ciclos final da PCR, que re-anelam com uma fita diferente concluindo a amplificação (PAABO *et al.*, 1992). Wang (1997) realizaram estudos *in vitro* a partir de uma mistura de DNA genômico de oito espécies diferentes de Actinomicetos para minimizar a formação das moléculas quiméricas, e mostraram uma taxa de formação de 32% de moléculas quiméricas em uma PCR de 30 ciclos, e numa reação com 25 ciclos, esta taxa diminuiu para 12%.

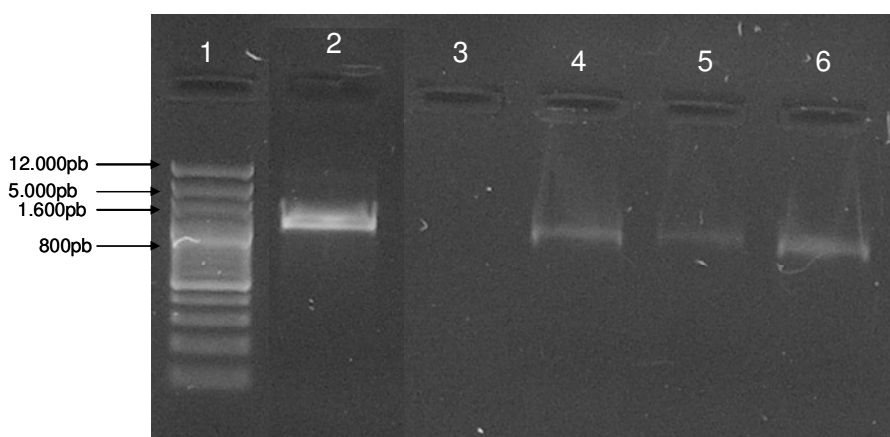


Figura 02 - Perfil eletroforético da amplificação do gene 16S rRNA para o Domínio *Archaea* em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etídeo. 1) Padrão Molecular 1 kb Plus DNA (Invitrogen); 2) Controle positivo (amostra padrão); 3) Controle negativo; 4) Amostra de solo TP2 10 cm; 5) Amostra de solo TP2 20 cm; 6) Amostra de solo TP2 30 cm

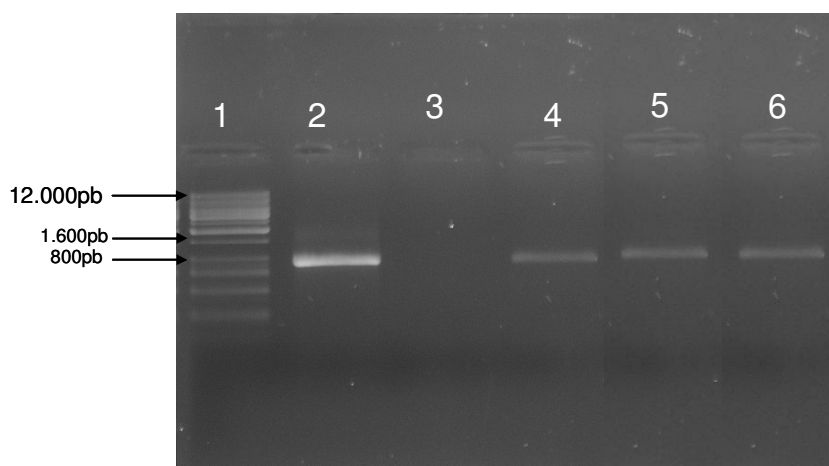


Figura 03 - Perfil eletroforético da amplificação do gene 16S rRNA para o Domínio *Archaea* em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etídeo; 1) Padrão Molecular 1 kb Plus DNA (Invitrogen); 2) Controle Positivo (amostra padrão); 3) Controle negativo; 4) Amostra de soloADJ 10 cm; 5) Amostra de solo ADJ20 cm; 6) Amostra de solo ADJ 30 cm

Construção das Bibliotecas 16S rRNA

Foram construídas duas bibliotecas a partir dos produtos de PCR purificados, duas para o Domínio *Archaea*, a qual denominamos de TPArch (referente ao solo de Terra Preta de Índio) e TAArch (referente a Terra Mulata ou Adjacente). E foram selecionados 672 clones transformantes para a biblioteca TPArch e 672 clones para TAArch. Houve diferença de números de clones selecionados das Bibliotecas para Bacteria, devido ao pouco tempo para a sua realização, pois a biblioteca de Archaea foi a última a ser trabalhada.

Para a confirmação da inserção dos fragmentos no vetor de clonagem, foram realizadas reações de PCR utilizando os iniciadores específicos, e o gene M13 foi utilizado para confirmar a presença do fragmento de tamanho desejado. O perfil da amplificação foi visualizado em gel de agarose a 0,8%, corado em brometo de etídeo e visualizado em fotodocumentador com auxílio de luz ultravioleta.

Sequenciamento parcial dos clones e Análise das seqüências

A extração do DNA plasmidial dos clones e a reação de seqüenciamento foram feitas em larga escala, 96 amostras por placa. Foram seqüenciados 3.264 clones, 672 clones pertencentes a cada biblioteca do Domínio *Archaea* (TPArch e TAArch).

Para este estudo, foi realizado o sequenciamento parcial, pois o objetivo do mesmo foi avaliar a diversidade e não realizar um estudo evolutivo, e também, devido ao alto custo que esta metodologia exige, por isso justifica-se a utilização de um único iniciador, e não os dois iniciadores que são comumente usado para o Domínio *Archaea* foi utilizado o iniciador 21f (“forward”).

Nas análises das seqüências realizadas pelos programas Phred/Phrap/Consed, disponíveis no site de Bioinformática da UFAM, foram descartadas as seqüências com bases de baixa qualidade (< 20), onde se encontra apenas um erro em cada 100 pb lidos. No final desta análise, foram obtidas então, 415 clones de TPArch e 415 clones de TAArch (Tabela 4).

Tabela 4 - Número total de clones seqüenciados e clones obtidos pertencentes às bibliotecas: TPArch e TAArch

Biblioteca	Clones seqüenciados	Clones obtidos
TPARCH	627	415
TAARCH	672	415

As seqüências obtidas foram comparadas com o banco genômico no “GenBank[®]” do NCBI, onde foi utilizada a ferramenta BLAST, visando a identificação das amostras encontradas. Para corroborar os resultados e obter dados mais completos, as seqüências foram analisadas no programa “Classifier”

disponível no site RPD II. O programa apresenta os mais altos níveis taxonômicos e segue a proposta do Manual de Bergey (Garrity *et al.*, 2004).

Em todas as seqüências comparadas utilizando o BLAST, apresentaram um índice de similaridade que variou entre 85 a 100%, e não foram observadas seqüências ainda não cadastradas. Porém, em alguns casos, a pontuação de confiabilidade se mostrou baixa, o que nos remete a idéia de serem seqüências de 16S rRNA não catalogadas no “GenBank®”. Isso pode acontecer, pois a riqueza e a diversidade bacteriana presentes nos solos é pouco explorada, necessitando de mais estudos para a detecção desses microrganismos.

Análise de diversidade do Domínio *Archaea*

Apesar do grupo de microrganismos mais estudado no solo pertencer ao Domínio Bacteria, há também muitas arqueas, fungos e vírus nesse ambiente (FIERER *et al.*, 2007), porém Esses últimos não foram objetos desta pesquisa. Em recentes pesquisas com solo, também indicam uma certa diversidade de *Archaea*, e em nosso trabalho, as seqüências analisadas nas duas bibliotecas construídas, pertencentes ao Domínio *Archaea*, obtiveram um índice acima de 95% de confiança.

Quanto ao número de seqüências identificadas como não-cultiváveis e/ou não-conhecidos foi na mesma proporcao que nas bibliotecas do Domínio Bacteria, ou seja, representando 52% das seqüências de TPArch (Figura 04) e 49% das seqüências em TAArch (Figura 05), podendo inferir que a diversidade nesse ambiente é altíssima, necessitando de mais estudos multidisciplinares quanto a diversidade, principalmente entre as técnicas da Microbiologia Clássica e Molecular.

Porém, não há a mesma diversidade de microrganismos já descritos, pois o Domínio Bacteria abrange um maior número de Ordem, Família e Classe, muito diferente do que ocorrem *Archaea*. E isto pode ser percebido pelas Figuras 17 e 18, que demonstram a pequena “diversidade” comparada ao Domínio Bacteria, pois nesse último, descrevemos pelos menos 10 Filos, já no Domínio *Archaea*, apenas dois Filos, Crenarcheota (40% na biblioteca TPArch e 46% na biblioteca TAArch) e Euryarcheota (8% na TPArch e 5% na TAArch), e Esses dados serão discutidos com maiores detalhes logo abaixo.

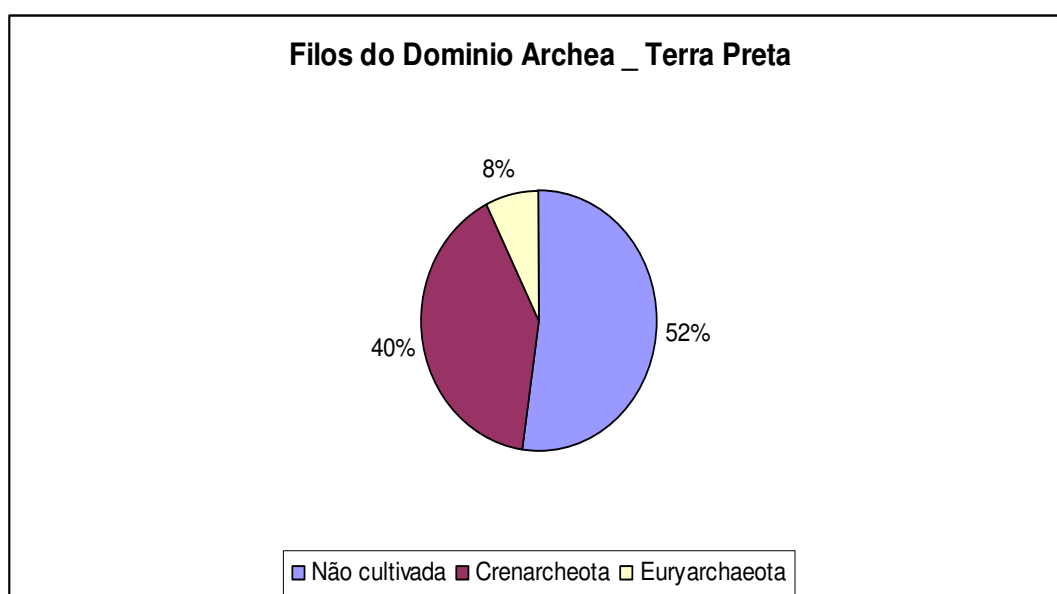


Figura 04 - Diversidade da *Archaea* dos clones 16s rRNA encontrados no solo TPI com base nos dados obtidos pela comparação nos bancos de dados do NCBI e RDP II

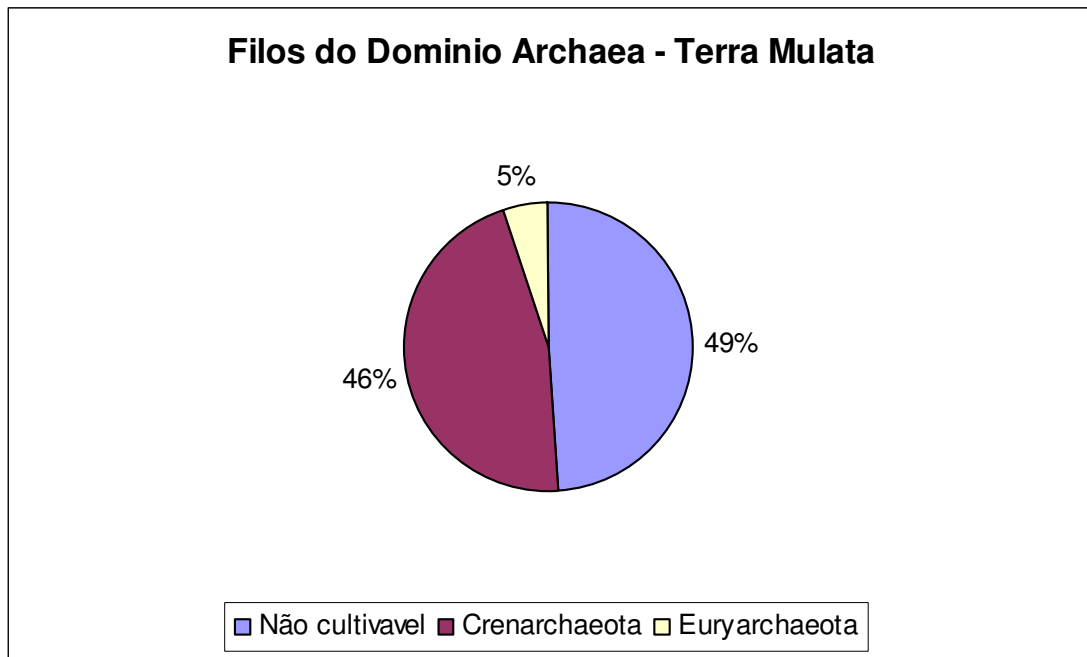


Figura 05 - Diversidade da *Archaea* dos clones 16s rRNA encontrados no solo TM com base nos dados obtidos pela comparação nos bancos de dados do NCBI e RDP II.

Na prática, as *Archaea* são estudadas e agrupadas de acordo com o seu metabolismo e fisiologia, sendo alocadas em diversos grupos, como: as metanogênicas, os halófilos extremos (ou hiperhalófilos) e os termófilos extremos (ou hipertermófilos). Sem dúvida, as espécies de *Archaea* mais conhecidas são as metanogênicas, cuja classificação taxonômica molecular data de 1979, realizada por Balch *et al.* Provavelmente, pela facilidade de estudos de ambientes anóxicos, ou mesmo pela sua importância em saneamento ambiental, existem cerca de 66 espécies de metanogênicas descritas, ao contrário das 24 espécies de hipertermófilas e 18 de halófilas extremas (ADAMS, 1995; SOWERS, 1995; MADIGAN *et al.*, 1997). Contudo, o número de novas espécies descritas nesses dois últimos grupos vem aumentando, em razão do crescente interesse em estudos da diversidade de *Archaea* em novos ambientes, que empregam metodologias moleculares para a identificação dos organismos através de DNA extraído diretamente das amostras.

Filo *Crenarchaeota*

O Filo *Crenarchaeota* separa-se muito próximo da raiz da árvore universal, sendo composto por organismos hipertermófilos (*Desulfurococcus*, *Pyrodictium*, *Sulfolobus*, *Thermococcus*, *Thermofilum* e *Thermoproteus*), e compreendendo os organismos capazes de crescer nas maiores temperaturas conhecidas. Esses hipertermófilos são, em sua maioria, quimiolitotróficos autotróficos, sendo então classificados como produtores primários. Nesse grupo há também organismos isolados (mas ainda não cultivados em laboratório) de ambientes frios, tais como águas oceânicas (KONNEKE *et al.*, 2005).

O maior índice de seqüências encontradas deste filo foram indivíduos da Classe *Thermoproteus* (Zillig e Stetter, 1989, 2001), Ordem Thermoproteales, Família *Thermoproteaceae*, com os gêneros *Pyrobaculum*, *Thermofilum* e *Thermoproteus*, isolados de áreas geotérmicas continentais.

***Archaea* Hipertermófilas:**

São microrganismos capazes de crescer em temperaturas extremas (acima do ponto de ebulição da água, com ótimo acima de 80°C). Foram inicialmente observados em amostras de solos e águas geotérmicas, contendo enxofre elementar e sulfetos. Posteriormente, os primeiros microrganismos hipertermófilos foram isolados em fendas térmicas vulcânicas no leito oceânico, sob temperaturas de 100°C, e foram estas descobertas que culminaram com a descrição do Domínio *Archaea* (ADAMS, 1995).

São anaeróbios obrigatórios, quimiorganotróficos ou quimiolitotróficos, e de alguma forma, utilizam compostos de enxofre no seu metabolismo. O estudo de uma variedade de habitats terrestres e aquáticos resultou no isolamento de diversas espécies hipertermófilas com morfologia peculiar, em geral esférica e irregular, ou

mesmo organismos com ausência de parede celular (*Thermoplasma acidophilum*). A taxonomia das espécies é baseada em métodos moleculares (seqüências do 16S rRNA), fisiologia (crescimento sob diferentes temperaturas e pH), morfologia celular, coloração de Gram e conteúdo de G+C do DNA .

Os organismos dos gêneros *Thermotaga* e *Aquifex*, filogeneticamente alocados no Domínio Bacteria, são estudados, em geral, em conjunto com as *Archaea* devido ao seu habitat marinho hipertermófilo.

Filo Euryarchaeota

Um grupo fisiologicamente diverso, sendo composto pelas *archaea* metanogênicas, encontradas em ambientes de condições extremas (*Methanococcus*, *Methanobacterium* e *Methanosarcina*) anaeróbios conhecidos, ou seja, o oxigênio mesmo em concentrações baixíssimas, exerce um efeito extremamente letal sobre os mesmos, e as *archaea* halofílicas extremas, aeróbias (*Halobacterium*, *Halococcus*).

Nesse Filo há ainda o gênero *Thermoplasma*, composto por bactérias acidófilas, termofílicas, que não apresentam parede celular. As halofílicas geralmente coram-se como Gram-negativas, não apresentam esporos e, em sua maioria, são imóveis, geralmente apresentando grandes plasmídeos, contendo cerca de 25 a 30% do DNA da célula. (MADIGAN *et al.*, 1997).

Archaea Halófilas Extremas:

É um grupo de organismos que habita ambientes altamente salinos, como: lagoas com elevada concentração salina (Ca, Mg, Na) ou mesmo a superfície de alimentos preservados por salmora. Os habitats das *Archaea* halófilas extremas são denominados hipersalinos e as espécies em cultivo laboratorial podem requerer entre 1,5 a 4 M de NaCl para seu crescimento, e esta elevada concentração de sódio é

essencial para a manutenção da estabilidade da parede celular em alguns organismos, como por exemplo em *Halobacterium* spp (MADIGAN *et al.*, 1997).

Dentre os ambientes naturais hipersalinos mais estudados encontram-se os sistemas lacustres com salinidade ao redor de 10 vezes a da água do mar, com predomínio de sais de sódio e presença de sulfatos e pH ligeiramente alcalino. As espécies halófilas extremas são, em geral, quimiorganotróficas aeróbias obrigatórias, com raros representantes halófilos anaeróbios e podem ainda apresentar a propriedade de síntese de energia mediada pela luz, na ausência de bacterioclorofilas e pela ação de bacteriorodopsinas (MADIGAN *et al.*, 1997).

As espécies de *Archaea* hiperhalófilas são classificadas filogeneticamente em 8 gêneros e 18 espécies, pela seqüência do 16S rRNA e pelas características morfo-fisiológicas (composição de parede celular, presença de flagelos, coloração de Gram, tolerância à salinidade, plasmídeos e conteúdo de G+C do DNA). Esses microrganismos apresentam, na sua maioria, morfologia celular em forma de cocos e bacilos e os ambientes mais estudados localizam-se em zonas hipersalinas de regiões temperadas, como os lagos salgados em Utah e na Califórnia (EUA), bem como o Mar Morto. (STALEY *et al.*, 1989; MADIGAN *et al.*, 1997).

***Archaea* Metanogênicas**

Os microrganismos de grupo são anaeróbios obrigatórios, que requerem condições anóxicas de crescimento, e altamente redutoras, com potenciais de oxidação-redução (SOWERS, 1995). Provavelmente, a característica mais evidente das metanogênicas está relacionada com sua especificidade de substratos para crescimento e produção de metano. São conhecidos até o momento dez substratos para a metanogênese: formiato, monóxido de carbono, metanol, 2-propanol, aminas

metiladas, dimetilsulfeto, metilmercaptanas e acetato, sendo universal o dióxido de carbono, que necessita de hidrogênio como doador de elétrons.

As *Archaea* metanogênicas atuam no passo final de consórcios microbianos presentes em sedimentos aquáticos, pântanos, gêisers, interior de árvores e sistemas de tratamento de resíduos, como biodigestores anaeróbios e aterros sanitários. Sob o ponto de vista ecológico, o metabolismo metanogênico é dependente da presença de outros microrganismos, cuja atividade no meio anaeróbio gera os precursores para a metanogênese (VAZOLLER, 1995).

As *Archaea* metanogênicas representam um grupo de microrganismos polifilético, compreendendo 3 Ordens, com 8 Famílias e 21 Gêneros. Apresentam morfologia comum às células procarióticas, com forma de bacilos de diferentes tamanhos, cocos, sarcinas e filamentos, além disso, algumas apresentam propriedade de coloração Gram-positiva e outras Gram-negativa, sendo a taxonomia baseada essencialmente em métodos moleculares pela comparação de seqüências do 16S rRNA. (SOWERS, 1995).

Filo *Korarchaeota*

O Filo *Korarchaeota* (que não foi encontrado nessa pesquisa) é composto quase que somente por isolados identificados apenas por sequenciamento de 16S rRNA, sendo considerado um grupo de hipertermófilos. Até o momento, poucas amostras de *Korarchaeota* foram cultivados em laboratório, mas pesquisas realizadas em uma fenda termal localizada no fundo do mar da Islândia, em 2002, levaram à identificação de uma nova espécie de *Archaea*, apresentando características bastante distintas, quando comparada aos demais membros desse Domínio. A espécie *Nanoarchaeum equitans* diferencia-se das demais *Archaea* por ser aparentemente muito primitiva (ou modificada), sendo encontrada em associação com outra *Archaea* (*Igniococcus* sp.).

Este microrganismo de morfologia arredondada é bastante diminuto, apresentando cerca de 400 nm de diâmetro e um pequeno genoma, de 0,5 Megabases. De acordo com os autores que a descreveram, as diferenças apresentadas por *Nanorachaeum* em relação à seqüência de RNA ribossomal, sugerem que tal organismo seja classificado em um novo Filo, proposto como *Nanoarchaeota* (DELWICHE *et al.*, 1996).

Elkins *et al.* (2008) sequenciaram a partir de uma cultura enriquecida, um membro nao-cultivável deste Filo, pelo método “shotgun” de amostra ambiental isoladas no Parque de Yellowstone, em 1996, e o denominaram de *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ou “Ca. K. Cryptofilum”.

Estimativa de riqueza e índice de diversidade

A estimativa do valor máximo de OTUs em um nível filogenético pode ser feita utilizando-se métodos estatísticos capazes de extrapolar a relação de OTUs em função do número de seqüências a partir da curva de rarefação ou de métodos não-paramétricos. Nesse trabalho, a riqueza de filotipos foi verificada pelo método de rarefação ao nível de 97% de similaridade e as curvas de rarefação resultantes foram ascendentes para as bibliotecas TPArch e TAArch, não atingindo o platô (Figuras 06 e 07). Esses resultados mostram que o número de seqüências do gene 16S rRNA para o Domínio *Archaea* pode não ser o suficiente para mostrar a riqueza destas comunidades, ou talvez pelo fato de somente serem classificadas a nível de Filo, pelos dois bancos de dados, BLAST/NCBI e RDP-II, porém as duas curvas se mostram relativamente parecidas, sendo que na Biblioteca TAArch houve uma leve diferenciação a partir de 100 seqüências analisadas.

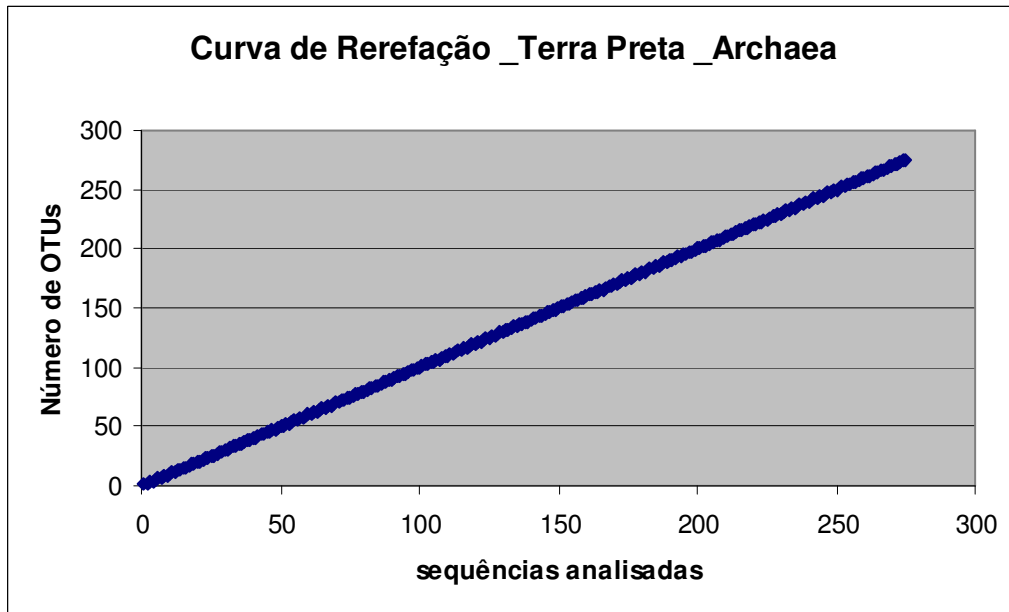


Figura 06 - Curva de rarefação gerada do gene 16S rRNA da biblioteca TPArch.

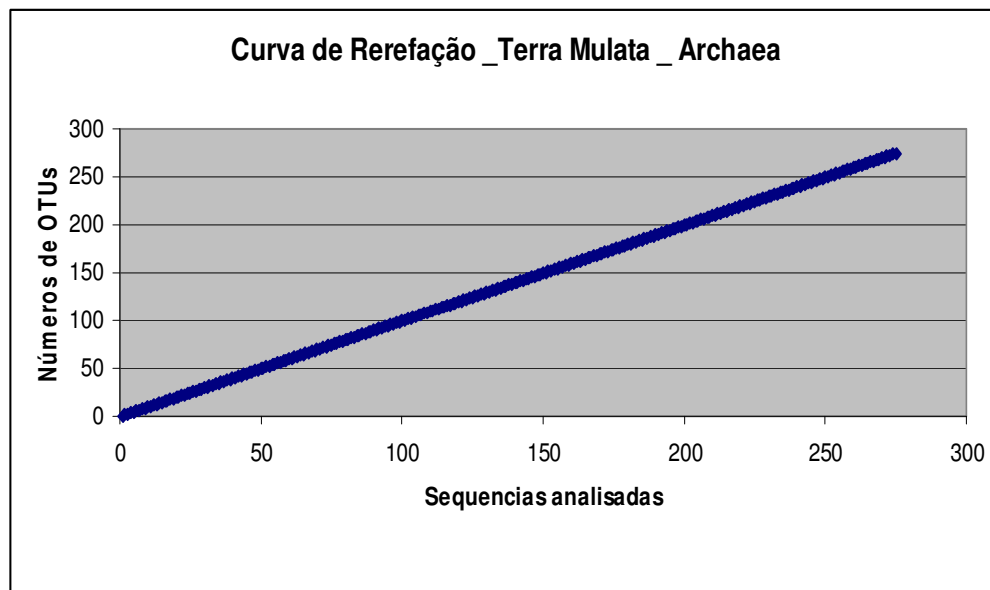


Figura 07 - Curva de rarefação gerada do gene 16S rRNA da biblioteca TAArch.

Tabela 5 - Estimativas de riquezas de OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) e índices de diversidade calculados a partir da bibliotecas de 16S rRNA dos Domínios Archaea dos solos de Terra Preta de Índio e Terra Mulata.

Biblioteca	ACE	Chao I	Jackknife	Bootstrap	Simpson	Shannon
TPARCH	241,95	245,9	355,2	177,1	0,0375	4,79
TAARCH	238,22	557,8	241,3	170,41	0,0031	5,462

Os cálculos da estimativa de riqueza de espécies pelos métodos não-paramétricos de ACE e Chao1, mostram uma diferença entre as bibliotecas, onde a biblioteca TPArch mostra um índice maior em relação á biblioteca TAArch. Estimativas de riqueza baseadas em Chao1 utilizam o número de espécies que ocorrem uma ou poucas vezes, para estimar o número de espécies desconhecidas. A informação de espécies desconhecidas. A informação de espécies desconhecidas é principalmente concentrada em espécies de baixa freqüência (CHAO, 1984; SHEN; CHAO; LIN, 2003; CHAO; SHEN; HWANG, 2006). Enquanto o estimador baseado na cobertura de abundância (ACE) separa as espécies observadas em grupos de espécies raras e abundantes, e somente utiliza o grupo de espécies raras para estimar o número de espécies desconhecidas (CHAO; LEE, 1992; CHAO; MA; YANG, 1993).

O número de espécies detectadas em uma amostra, ou o número de organismos identificados dentro de um dado nível taxonômico, é fortemente afetado pelo número de seqüências analisadas (JASEN, 2006; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2006). A utilização de bibliotecas de clones 16S rRNA pode não representar totalmente as comunidades microbianas dos solos. Isso ocorre devido a limitações inerentes a técnicas, que incluem a variabilidade genética do fragmento analisado e

a amplificação preferencial de rRNA de grupos dominantes através de PCR (CURY, 2006). Ainda, estimativas de riqueza de espécies bacterianas em solos apontam para uma diversidade elevada, aumentando a necessidade de um maior esforço amostral para uma completa caracterização desta diversidade (CURTIS; SLOAN; SCANNELL, 2002; ROESCH et al 2007; TORSVIK; GOKSOYR; DAAE, 1990).

Os valores obtidos com o índice de diversidade de Simpson revelaram maior diversidade de OTUs nas biblioteca TPArch se comparando aos valores obtidos para as duas bibliotecas (tabela 8). Os resultados para o índice de Shannon mostram um índice elevados TAArch. As estimativas feitas pelo bootstrap corroboram diretamente os valores de diversidade obtidos pelos índices de Simpson e Shannon (tabela 4). A justificativa para tal relação encontra-se no fato deste estimador basear-se em subamostragens do conjunto de OTUs utilizado para o cálculo destas medidas de diversidade das bibliotecas. O estimador Jackknife de riqueza de OTUs revelou uma relação diferente. Onde as bibliotecas provenientes da Terra Preta de Índio se mostraram mais elevadas. Uma explicação pode ser pelo fato deste resultado mostrar apenas as OTUs únicas presentes para o cálculo empregadas pelo estimador de Jackknife. Uma maior probabilidade de ocorrência de OTUs únicas empregadas pelo estimador de Jackknife é revelada pela maior frequência de filotipos nas bibliotecas de Terra Preta.

Análises Filogenéticas

Devido aos altos índices de seqüências de organismos não cultivados eou não classificados tanto do Domínio Bacteria quanto do Domínio *Archaea* nos solos estudados, nesse trabalho, foram afeitas análises filogenéticas utilizando o programa MEGA 4.0. Tais análises não tinham como objetivo realizar a classificação

filogenética e evolutiva dos microrganismos, mas apenas auxiliar o agrupamento das seqüências ditas não classificadas em relação aos filos à que possam pertencer ou se aproximar filogeneticamente. Esse tipo de informação de sequenciamento da subunidade 16S rRNA não é suficiente para caracterizar as comunidades de microrganismos desconhecidos em nível de gênero ou espécie, precisa-se de mais informações sobre análises fisiológicas e morfológicas através de cultivo em meio de cultura (GARRITY *et al.*, 2004). Entretanto, essa classificação possibilitou observar diferenças entre as comunidades.

Para essas análises o modelo de árvore filogenética foi da Máxima Parcimônia, que se baseia sob uma perspectiva probabilística em um modelo de evolução, escolhe o caminho “menos tortuoso”, ou seja, aquele que necessita de um menor número de pressupostos. Seu princípio fundamental está na idéia de que os eventos de substituições independentes gerando condições finais iguais devem ser vistos como menos prováveis e, portanto, devem ser minimizados. (JIN e NEI, 1990; NEI *et al* 2000).

A árvore filogenética pertencente a biblioteca TPArch mostrou uma divisão em 13 Clusters principais, onde os filos descritos se separam nitidamente, houveram cluster onde somente as amostras nomeadas pelos bancos de dados se agrupam entre si, mas sempre próximo ao clado irmão de um dos filos. Já na árvore filogenética da biblioteca TAArch, mostrou uma divisão em 15 clusters principais, onde também os filos ficaram nitidamente separados, porém ambas as análises com inferência do bootstrap, mostrou-se um alto índice de confiança.

Essa relação mostra um intuito de tentar inserir, os organismos não classificados, pois somente com o sequenciamento completo do gene 16S rRNA, ou do seu genoma completo, além de análises de Microbiologia Clássica que envolve o

isolamento, e tEsses bioquímicos, é que se pode descrever Esses indivíduos como sendo organismos de uma nova espécie.

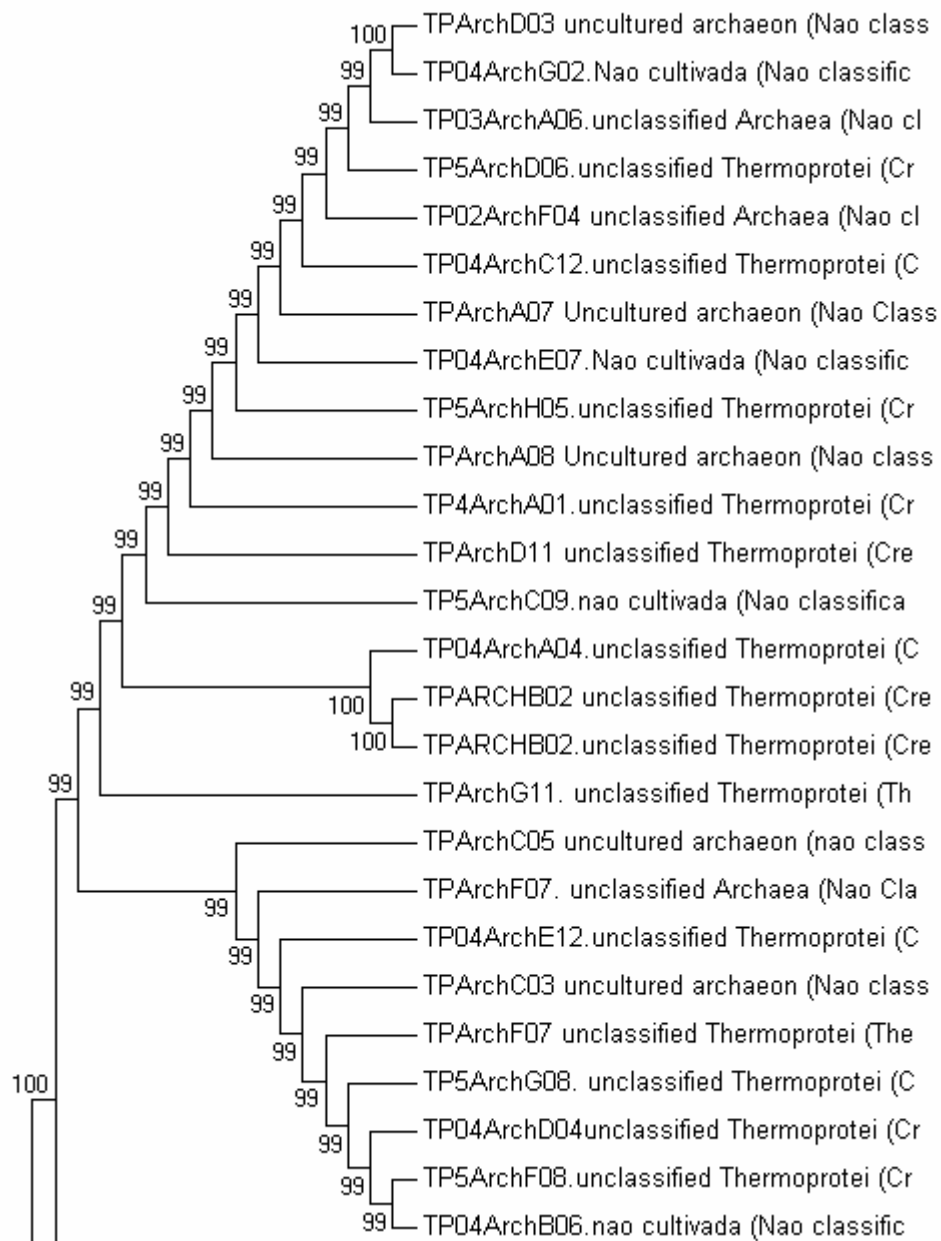


Figura 8 - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos . *Crenarchaeota*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Preta. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 réplicas

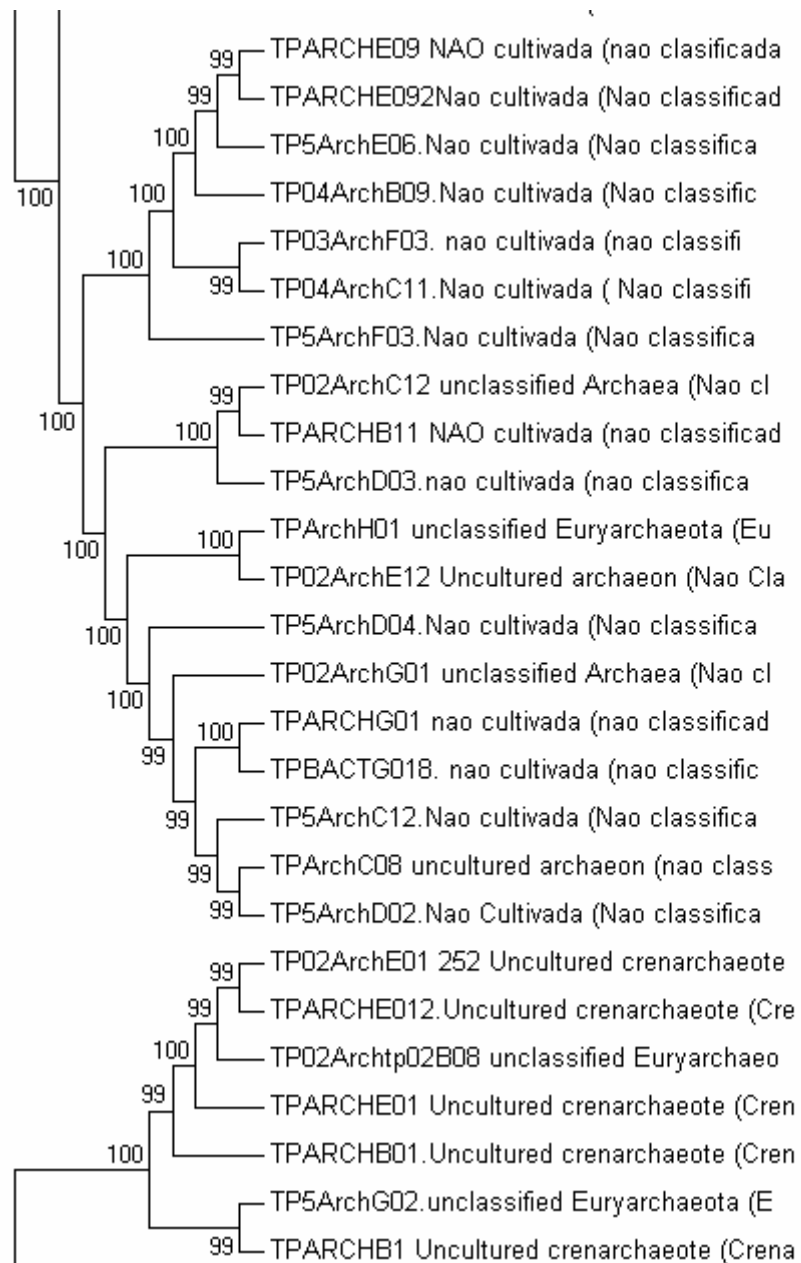


Figura 09 - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Preta. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 réplicas

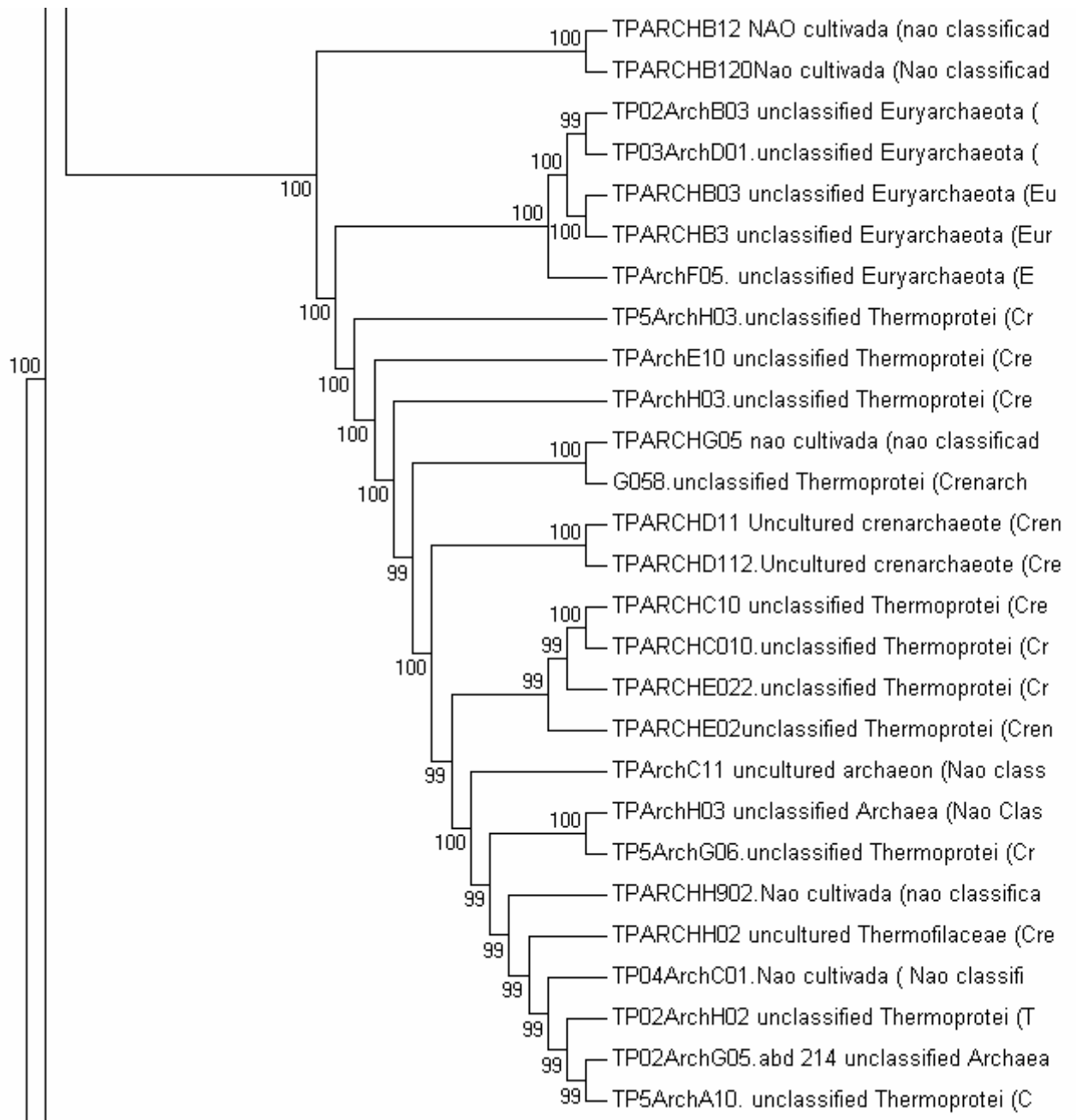


Figura 10 - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Euryarcheota* e *Crenarchaeota*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Preta. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 réplicas

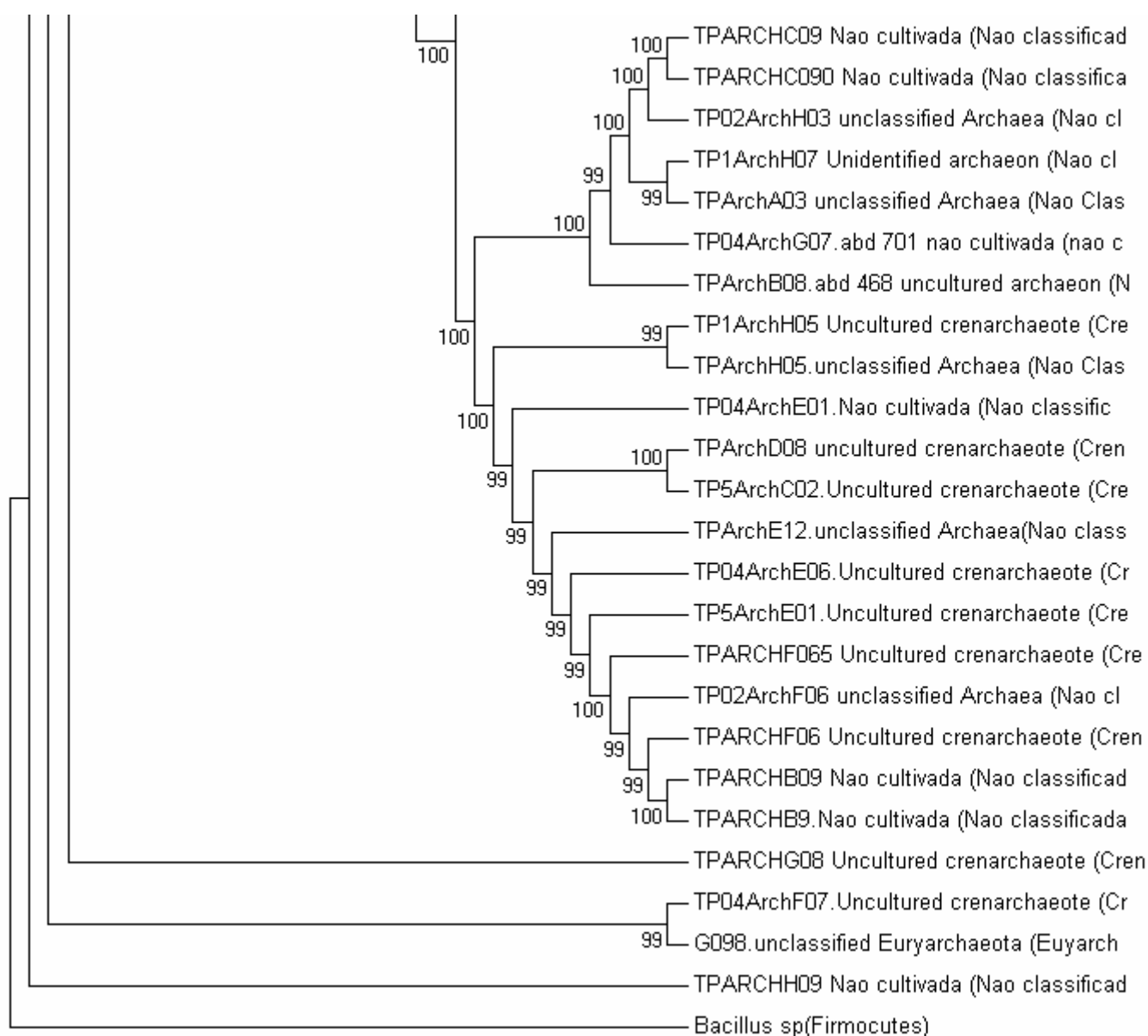


Figura 11 - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Euryarcheota* e *Crenarchaeota*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Preta, com o grupo externo pertencente ao Domínio Bacteria. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 réplicas

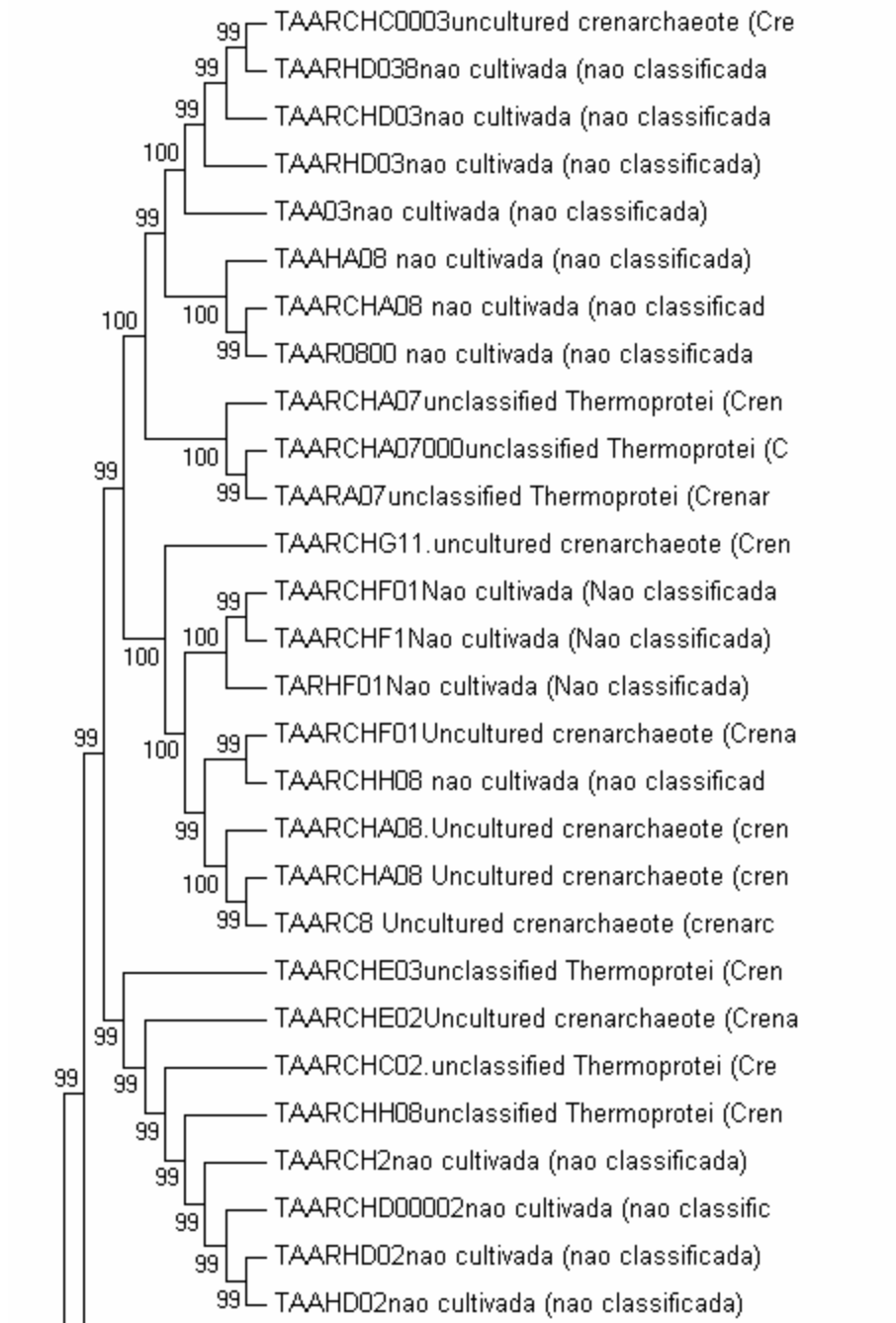


Figura 12 - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencente ao Filo. *Crenarchaeota*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Mulata. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo “Jukes Cantor” e “Neighbor-Joining” com “bootstrap” de 1000 réplicas

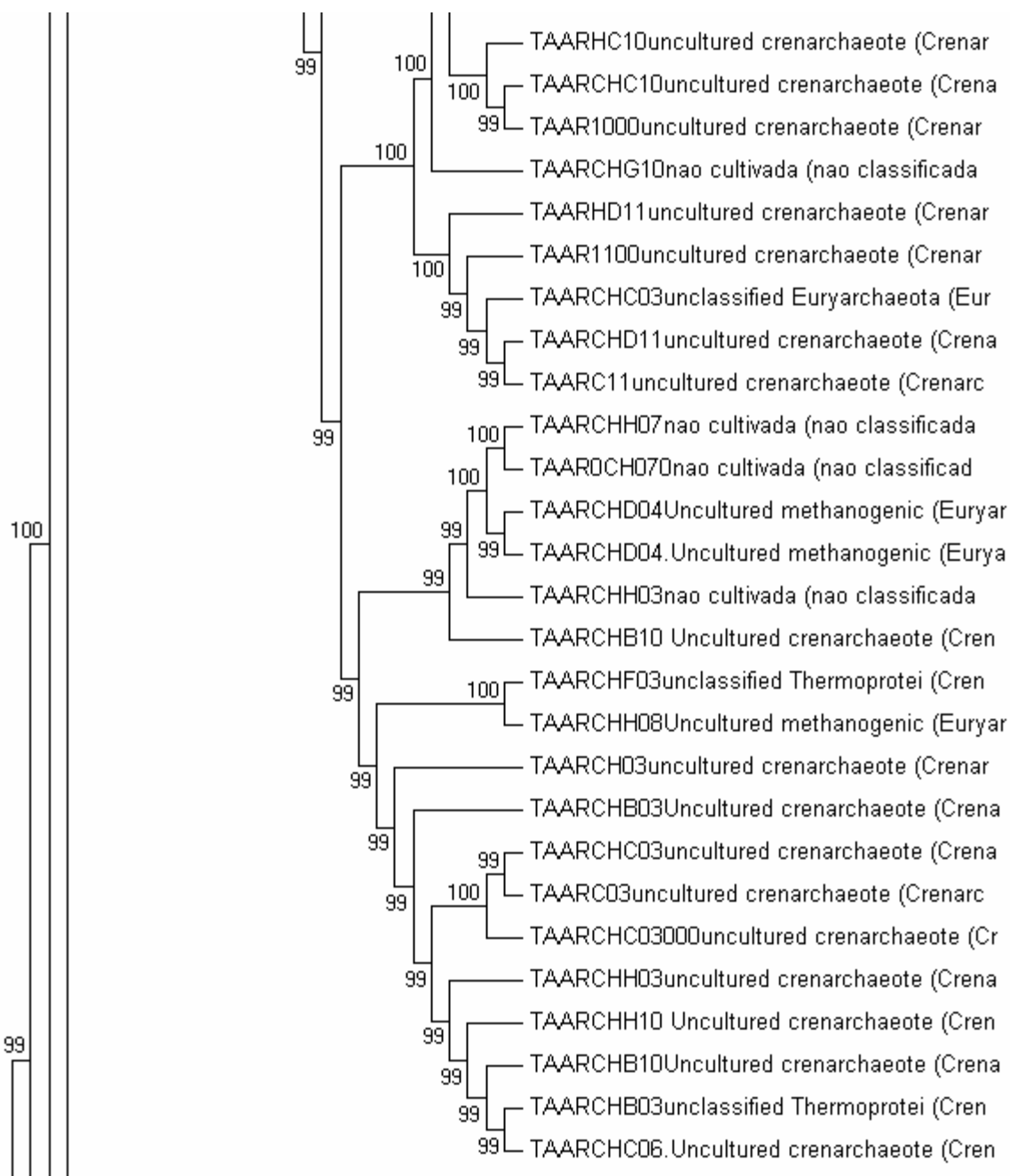


Figura 13 - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Euryarcheota* e *Crenarchaeota*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Mulata. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 réplicas

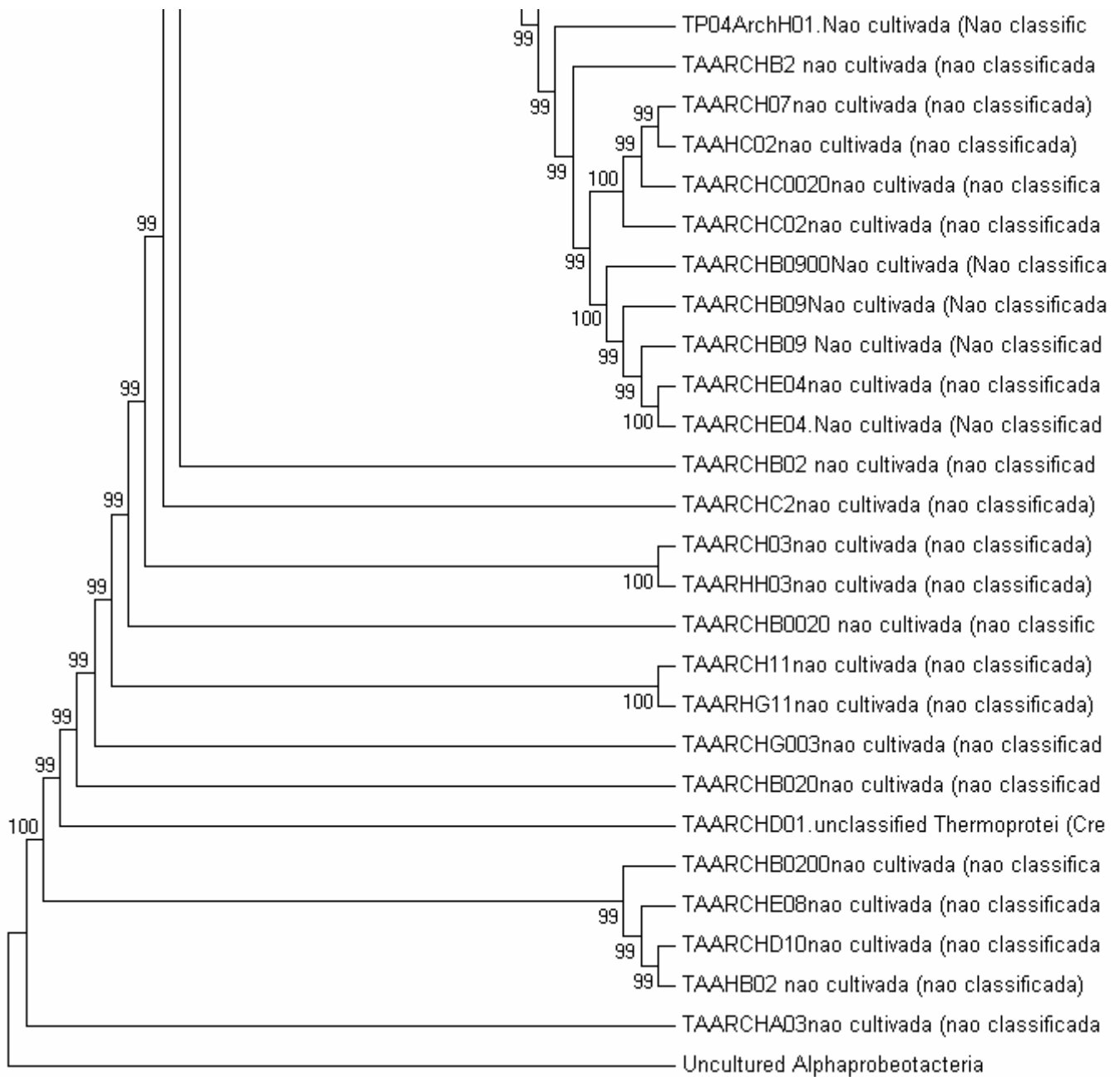


Figura 14 - Dendrograma Filogenético exibindo os clones pertencentes aos Filos *Euryarcheota* e *Crenarchaeota*, obtidos com seqüências parciais do gene 16S rRNA (5'-3') do solo de Terra Mulata, com o grupo externo do Domínio Bacteria. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelo algoritmo "Jukes Cantor" e "Neighbor-Joining" com "bootstrap" de 1000 réplicas. Com grupo externo.

CONCLUSÕES

Com a construção de bibliotecas com 672 clones de 16S rRNA a partir de solos e posterior análise comparativa das seqüências usando os bancos de dados do NCBI (BLAST) e RDP-II, determinou-se a estrutura das comunidades de arqueias prevalentes em amostras dos solos, que possibilitou a identificação dos filos predominantes, sendo que os microrganismos desconhecidos e ou não-cultivados representam 52% das seqüências de TPArch e 49% das seqüências em TAArch.

No Domínio *Archaea* não há a mesma diversidade de microrganismos já descritos no Domínio Bacteria, pois foram encontrados apenas dois Filos: *Crenarcheota* (40% na biblioteca TPArch e 46% na biblioteca TAArch) e *Euryarcheota* (8% na TPArch e 5% na TAArch).

A técnica molecular permitiu o estudo da diversidade do Domínio *Archaea*, mesmo utilizando uma pequena amostra de solo. As das seqüências genéticas obtidas permitiu uma caracterização de vários organismos classificados como não-classificada nos bancos de dados.

Nesse trabalho, a riqueza de filotipos foi verificada pelo método de rarefação ao nível de 97% de similaridade e as curvas de rarefação resultantes foram ascendentes para as bibliotecas TPArch e TAArch, não atingindo o platô, talvez pelo fato de somente serem classificadas a nível de Filo pelos dois bancos de dados, BLAST/NCBI e RDP-II, porém as duas curvas se mostraram relativamente parecidas, sendo que na Biblioteca TAArch houve uma leve diferença a partir de 100 seqüências analisadas.

Os resultados do presente trabalho visaram contribuir com o conhecimento sobre a diversidade do Domínio *Archaea* em Solo de Terra Preta de Índio e Terra Mulata, tendo em vista que é ainda um grupo pouco estudado em solos amazônicos. Para tentar compreender as funções exercidas no solo e suas interações com outros componentes da biodiversidade e com os outros organismos presentes nesse ecossistema estudado.

Espera-se compreender a relação entre a composição, abundância e diversidade dos microrganismos do solo, com a sustentabilidade da fertilidade do solo e a produção agrícola, e os efeitos ambientais, como emissão de gases de efeito estufa e seqüestro de carbono, já que esse Domínio apresenta organismos que emitem carbono e outros que só se desenvolvem na presença de dióxido de carbono.

REFÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADAMS, M.W.W. 1995. Thermophilic Archaea: an overview. In: Archaea . a laboratory manual: Thermophiles. Robb, F.T. & Place, A.R. (eds.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 3-7.
- BALCH, W.E.; FOX, G.E.; MAGRUM, J.L.; WOESE, C.R. & WOLFE, R.S. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews*, 43:260-296.
- BANO, N., S. RUFFIN, B. RANSOM, AND J.T. HOLLIBAUGH. Phylogenetic composition of Arctic Ocean archaeal assemblages and comparison with Antarctic assemblages. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 781-789. 2004.
- BARNS, S.M.; FUNDYGA, R.E.; JEFFRIES, M.W. & PACE, N.R. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91:1609–1613, 1994.
- BARNS, S.; DELWICHE, C.F.; PALMER, J.D.; PACE, N.R. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93** (17): 9188–93. 1996.
- BINTRIM, S.B., T.J. DONOHUE, J. HANDELSMAN, G.P. ROBERTS, AND R.M. GOODMAN. Molecular phylogeny of archaea from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 277-282, 1997
- BROCKS, J. J., LOGAN, G. A., BUICK, R. & SUMMONS, R. E. Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science* 285, 1033–1036, 1999.
- CAVALIER-SMITH, T. 2002. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 7–76,
- CHAPPE B, ALBRECHT P, MICHAELIS W 1982 . "Polar Lipids of Archaeobacteria in Sediments and Petroleums". *Science* **217** (4554): 65–66.
- CHAO, A. LEE, S.M. 1992. Estimating the number of classes via simple coravarege. *Journal of the American Statistical Association*, Alexandria, v. 87, p. 210-217.
- CHAO, A.; MA, M-A.; YANG, M.C.K. 1993 Stopping rule and stimation for recapture debugging with unequal detectionrats. *Biometrika*, London, v.80, p. 193-201.
- CURY, J.C. 2006. Diversidade de Bcatria e Archaea em solos de mangue e marisma. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição e Plantas) Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

- CURTIS, T.P.; SLOAN, W.W.; SCANNELL, J.W. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A*, Washington, v. 99, p. 10494-99.
- DELONG, E.F. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 5685-5689. 1992
- ELKINS, J. G., M. PODAR, D. E. GRAHAM, K. S. MAKAROVA, Y. WOLF, L. RANDAU, B. P. HEDLUND, C. BROCHIER, V. KUNIN, I. ANDERSON, A. LAPIDUS, E. GOLTSMAN, K. BERRY, E. V. KOONIN, P. HUGENHOLTZ, N. KYRPIDES, G. WANNER, P. RICHARDSON, M. KELLER, AND K. O. STETTER. 2008. A korarchaeal genome reveals new insights into the evolution of the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **in press**.
- FORTERRE, P. & PHILIPPE, H. The last universal common ancestor (LUCA), simple or complex? *Biol. Bull.* 196, 373–375. 1999.
- GRIBALDO, S. & PHILIPPE, H. Ancient phylogenetic relationships. *Theor. Popul. Biol.* 61, 391–408, 2002
- GUPTA, R. S. What are archaeobacteria: life's third domain or monoderm prokaryotes related to Grampositive bacteria? A new proposal for the classification of prokaryotic organisms. *Mol. Microbiol.* 229, 695–708, 1998
- HALL, T. A. *BioEdit*: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98. 1999.
- HAHN; PAT HAUG. 1986 Traces of Archaeobacteria in ancient sediments. *System Applied Microbiology* 7 (Archaeobacteria '85 Proceedings): 178–83..
- JANSSEN PH (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 72:1719–1728
- KARNER, M. B., DELONG, E. F. & KARL, D. M. 2001 Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409, 507–510.
- KONNEKE, M.; BERNHARD, A.E.; TORRE, J.R. DE LA.; WALKER, C. B.; WATERBURY, J.B.; STAHL, D.A. 2005. isolation of a autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, london, v. 47, p. 5543-546.
- LAKE, J.A.. Origin of the eukaryotic nucleus determined by rate-invariant analysis of rRNA sequences. *Nature* 331 (6152): 184–6, 1988.
- LOPEZ-GARCIA, P., LOPEZ-LOPEZ, A., MOREIRA, D. & RODRIGUEZ-VALERA, F. Diversity of free-living prokaryotes from a deep-sea site at the Antarctic Polar Front. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, 193–202. 2001.

- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. & PARKER, J. 1997. Brock biology of microorganisms. 8a Ed. Caps. 15, 16 e 17. New Jersey: Prentice-Hall. p. 606-768.
- MASSANA, R., A.E. MURRAY, C.M. PRESTON, AND E.F. DELONG. 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic archaea in the Santa Barbara channel. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 50-56,
- MACGREGOR BJ, MOSER DP, ALM EW, NEALSON KH, STAHL DA (1997) Crenarchaeota in Lake Michigan sediment. *Appl Environ Microbiol* 63:1178–1181
- NELSON, K.E.; CLAYTON, R.A.; GILL, S.R., 1999 *et al.* Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399** (6734): 323–9,.
- NEI. M. E KUMAR, S. 2000 Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University press, New York.
- PAABO, S.; IRWIN, D.M.; WILSON, A.C. 1992. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *Journal of Biological Chemistry* 267:11036–11041.
- ROTHSCHILD, L. J. & MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. *Nature* 409, 1092–1101. 2001
- SCHLEPER, C., JURGENS, G. & JONUSCHEIT, M. 2005 Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 479–488.
- SCHLOTTER M, LEBUHN M, HEULIN T, HARTMANN A. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiol Rev.* 24 (5):647-60. Review, 2000.
- SCHLOSS, P.D., HANDELSMAN, J., 2006. Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comput. Biol.* 2, 786–793.
- SHEN, T.J., CHAO, A., LIN, C.F., 2003. Predicting the number of new species in further taxonomic sampling. *Ecology* 84, 798–804.
- SHEN, J., LIU, X., WANG, S., AND RYO, M. (2006) Paleoclimate changes in the Qinghai Lake area during the last 18 000 years. *Quatern Int* **136**: 131–140.
- SOWERS, T.; BERNAD, S.; ABALLAIN, O.; CHAPPELAZ, J.; BARNOLA, J.M.; MARIK, T. 2005. records of the sigma 13 of atmospheric CH₄ over the last 12 centuries as recorded in antarctic snow and ice. *Global Geochemical Cycles*, Washington, v.19, p.1-12.
- STALEY, J.T. & HOLT, J.G. 1989 *Bergey's manual of systematic bacteriology*. v 3: Archaeobacteria, Cyanobacteria, and the remaining Gram-negatives. Baltimore: Williams & Wilkins, Co. (eds.).

- TORSVIK, V.; ØVREAS, L. , 2002 Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion In Microbiology*, v. 5, p. 240-245.
- TREUSCH, A.; KLETZIN, A.; RADDATZ, G.; OCHSENREITER, T.; QUAISER, A.; SCHUSTER, C.; AND SCHELEPER, C. 2004. Characterization of large-insert DNA libraries from soil for environmental genomic studies of Archaea. *Environmental Microbiology*, Oxford, v.6, p. 970-980,
- VAZOLLER, R.F. 1995. Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. Tese de Doutorado. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos/USP.
- WOESE CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 51 (2):221-71. Review, 1987.
- WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87** (12): 4576–9. 1990.
- WOESE C. The universal ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95** (12): 6854–9, 1998.
- YUTIN N, MAKAROVA KS, MEKHEDOV SL, WOLF YI, KOONIN EV. 2008. The deep archaeal roots of eukaryotes . *Mol. Biol. Evol.* **25**: 1619.
- ZILLIG W & REYSENBACH AL (2001) Thermococcales. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1 (Boone DR, Castenholz RW & Garrity G, eds), pp. 341–348. Springer- Verlag, New York.
- ZILLIG, W., H.P. KLENK, P. PALM, G. PUHLER, F. GROPP, R.A. GARRETT, AND H. LEFFERS. 1989. The phylogenetic relations of DNA-dependent RNA polymerases of archaebacteria, eukaryotes, and eubacteria. *Can. J. Microbiol.* **35**: 73–80.

CONCLUSÃO GERAL

O pH pode ser um dos atributos dos solos que pode ter influência direta na diversidade bacteriana dos solos estudados, pois observou-se que as amostras de TPI mostraram valores baixíssimos de pH quando comparados com os solos de TM.

Foram observados também altos teores de cálcio (Ca) e fósforo (P), porém baixa saturação por alumínio, o alto valor da capacidade de troca catiônica (CTC), quando comparados com os solos de TM. Esses valores confirmam a elevada fertilidade desses solos, sendo que o valor desta capacidade varia com o teor e a natureza da argila, mas principalmente com o teor de matéria orgânica.

As análises físicas mostraram que os solos de TPI e TM são diferentes entre si, pois a TPI possui uma elevada quantidade de silte e argila (o que dificultou a obtenção de DNA mais íntegro, já que o mesmo pode ficar retido por mais tempo no solo), e a TM demonstrou ter uma grande quantidade de areia.

Com a construção de bibliotecas com clones de 16S rRNA a partir de solos e posterior análise comparativa das seqüências usando os bancos de dados do NCBI (BLAST) e RDP-II, determinou-se a estrutura das comunidades de microbianas prevalentes nos solos, que possibilitou a identificação dos filos predominantes, sendo que os microrganismos desconhecidos e ou não-cultivados representam 52% das seqüências de TPArch e 49% das seqüências em TAArch. representam 38% das seqüências em TPBact e 58% em TABact.

O Filo mais predominante nos dois solos pesquisados nesse trabalho foi o da *Acidobacteria*, representando 20% do total de seqüências na TPBact e 11% na TABact.

Os outros Filos encontrados na biblioteca TPBact podemos destacar: *Nitrospira* e *Firmicutes*, com freqüência de 8% e 7%, respectivamente; *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* e *Proteobacteria* (5%); *Cloroflexi* (3%); *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Sphigobacteria* e *Verrucomicrobia* (2%).

Na biblioteca TABact, os Filos em destaque foram: *Sphigobacteria* com freqüência de 5%; *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* (4%), *Betaproteobacteria* e *Firmicutes* (3%); *Aquificae* e *Proteobacteria* (2%); e por fim, *Nitrospira* 1%.

No Domínio *Archaea* não há a mesma diversidade de microrganismos já descritos na literatura, pois foram encontrados apenas dois Filos: *Crenarcheota* (40% na biblioteca TPArch e 46% na biblioteca TAArch) e *Euryarcheota* (8% na TPArch e 5% na TAArch).

A estimativa da riqueza de OTUs pelo Bootstrap corrobora diretamente com os valores de diversidade obtidos pelos índices de Simpson e Shannon. De um modo geral, uma maior probabilidade de ocorrência de OTUs únicas empregadas pelo estimador Jackknife se correlacionou com uma maior freqüência de baixos percentuais de filotipos nas bibliotecas. Os valores obtidos com os métodos não-

paramétricos ACE e Chao1 para a estimativa da riqueza de OTUs corroboram com os valores obtidos com o estimador Jackknife.

Os resultados do presente trabalho visaram contribuir com o conhecimento sobre a diversidade bacteriana em Solo de Terra Preta de Índio e Terra Mulata, para a compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas no solo e o conhecimento de suas interações com outros componentes da biodiversidade, além de benefícios econômicos e estratégicos, como a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis em processos biotecnológicos.

anexos

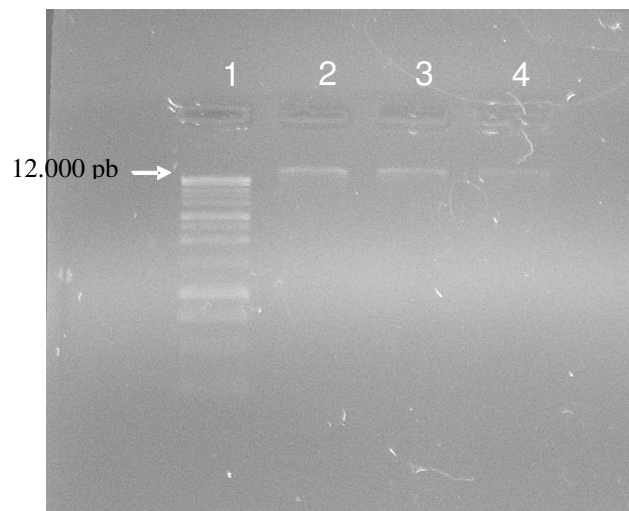
Anexo



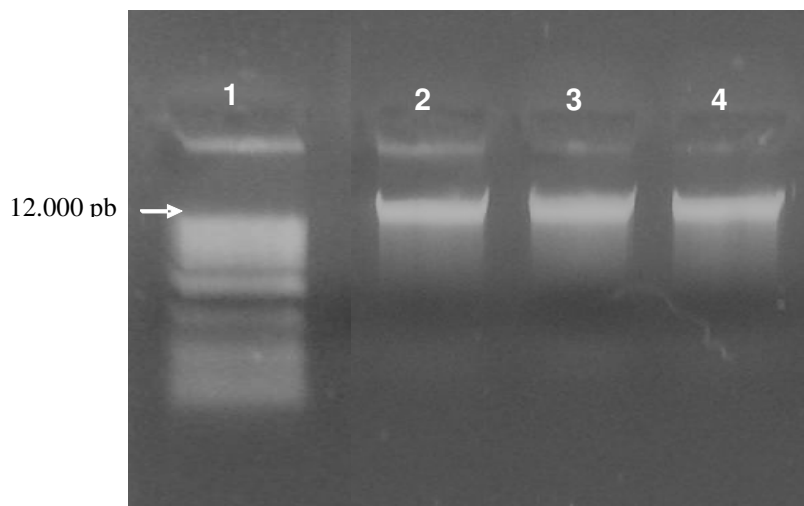
A área de estudo foi o município de Presidente Figueiredo no Estado do Amazonas (Fonte: Google maps).



Trincheira feita na área de estudo para a realização das coletas em diferentes profundidades



Perfil eletroforético da extração de DNA em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etídio. 1) Padrão Molecular 1 Kb plus DNA (Invitrogen); 2) Amostra de solo de TP2 10 cm; 3) Amostra de solo de TP2 20 cm; 4) Amostra de solo de TP2 30 cm



Perfil eletroforético da extração de DNA em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etídio. 1) Padrão Molecular 1 Kb plus DNA (Invitrogen); 2) Amostra de solo de ADJ2 10 cm; 3) Amostra de solo de ADJ2 20 cm; 4) Amostra de solo de ADJ2 30 cm

