

**BACTERIAL COMMUNITY DIVERSITY AND  
STRUCTURE IN SOILS FROM DIFFERENT  
LAND USE SYSTEMS OF THE WESTERN  
BRAZILIAN AMAZON EVALUATED BY  
T-RFLP AND SEQUENCING ANALYSES**

**EDERSON DA CONCEIÇÃO JESUS**

**2008**

**EDERSON DA CONCEIÇÃO JESUS**

**BACTERIAL COMMUNITY DIVERSITY AND STRUCTURE IN SOILS  
FROM DIFFERENT LAND USE SYSTEMS OF THE WESTERN  
BRAZILIAN AMAZON EVALUATED BY T-RFLP AND SEQUENCING  
ANALYSES**

Thesis presented to the Federal University of  
Lavras as part of the requirements of the Soil  
Science Graduate Program to the obtainment of  
the title of “Doctor”.

Advisor

Doctor Fátima Maria de Souza Moreira

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRAZIL  
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Jesus, Ederson da Conceição.

Bacterial community diversity and structure in soils from different land use systems of the Western Brazilian Amazon evaluated by T-RFLP and sequencing analyses / Ederson da Conceição Jesus . -- Lavras : UFLA, 2008.

170 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientadora: Fátima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Bactéria. 2. Diversidade. 3. 16S rRNA. 4. T-RFLP 5. Clonagem I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-631.46

**EDERSON DA CONCEIÇÃO JESUS**

**BACTERIAL COMMUNITY DIVERSITY AND STRUCTURE IN SOILS  
FROM DIFFERENT LAND USE SYSTEMS OF THE WESTERN  
BRAZILIAN AMAZON EVALUATED BY T-RFLP AND SEQUENCING  
ANALYSES**

Thesis presented to the Federal University of  
Lavras as part of the requirements of the Soil  
Science Graduate Program to the obtainment of  
the title of “Doctor”.

APROVED on 22th February 2008

PhD. José Oswaldo Siqueira

UFLA

Doctor. Siu Mui Tsai

CENA/USP

Doctor Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

UNESP/Jaboticabal

Doctor Vivian Helena Pellizari

USP

Doctor Fátima Maria de Souza Moreira  
UFLA  
(Advisor)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRAZIL  
2008



A minha família, amigos e a todos que de alguma forma colaboraram para concretização deste trabalho, dedico.

## AGRADECIMENTOS

*“E aprendi que se depende sempre de tanta, muita diferente gente. Toda pessoa sempre é as marcas das lições diárias de outras tantas pessoas.”*

Como diz o trecho acima, retirado de uma canção de Gonzaguinha, somos todos frutos das lições que aprendemos diariamente com outras pessoas. Não apenas lições profissionais, como é o caso de um trabalho de doutorado, mas também lições de vida.. É como bem escreveu Salomão: “como o ferro com o ferro e afia, assim o homem ao seu companheiro” (Pv. 27.17). Por isso, gostaria de expressar aqui os meus agradecimentos àqueles que colaboraram com sua ajuda, ensinamentos, amizade e colaboração para que este trabalho viesse a ser concretizado.

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e pela força para conclusão deste trabalho. Agradeço aos meus pais, Elias Silva de Jesus e Verginia da Conceição Jesus, pelos ensinamentos de toda uma vida, pelo incentivo, e por suas orações; à professora Fátima Maria de Souza Moreira pela orientação, pelo incentivo e pela amizade; aos professores James M. Tiedje e Terence L. Marsh pela orientação e incentivo; aos professores Siu Mui Tsai, Vivian Helena Pellizari, Eliana Gertrudes de Macedo Lemos e José Oswaldo Siqueira, que gentilmente aceitaram participar da banca e que contribuíram com suas sugestões; à Capes, a qual concedeu-me a bolsa de doutorado no Brasil e a bolsa de doutorado sanduíche; ao TSBF-CIAT/GEF-UNEP, ao projeto *Conservation and Sustainable Management of Below Ground Biodiversity* (CSM-BGBD/GF2715-02) e ao Center for Microbial Ecology pelo financiamento, indispensável para a realização deste trabalho; ao doutor E. Durant McArthur da Rocky Mountain Research Station e aos doutores Mike T. Friggens e Scott L. Collins da Sevilleta LTER e Universidade do Novo México que gentilmente

coletaram amostras de solo na Great Basin Experimental Range e em Sevilleta e ajudaram com informação sobre os sítios de coleta; aos amigos da microbiologia do solo pela amizade e, em especial, a Marlene, Michele, Adriana e Krisle que me auxiliaram durante o período de estágio no exterior; aos amigos e amigas do Departamento de Ciência do Solo da UFLA, pela amizade e incentivo; aos professores do Departamento de Ciência do Solo da UFLA pela incentivo e pelos ensinamentos; aos colegas e amigos da Michigan State University, que colaboraram para a realização deste trabalho; aos amigos da Little Flock Fellowship e da United Methodist Church pela amizade e suporte durante a minha estada em East Lansing; aos amigos da Aliança Bíblica Universitária de Lavras e da Segunda Igreja Presbiteriana de Lavras, pela amizade e apoio espiritual.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

I would like to express my sincere thanks to all who collaborated to this work. I acknowledge Dr. Fátima Maria de Souza Moreira, Dr. James M. Tiedje and Dr. Terence L. Marsh for their support and advice which were essential to the realization of this work; the evaluation committee - Siu Mui Tsai, Vivian Helena Pellizari, Eliana Gertrudes de Macedo Lemos and José Oswaldo Siqueira – for their suggestions; the Global Environmental Facility/United Nations Environment Programme (GEF/UNEP project CSM-BGBD/GF2715-02 with the global coordination of CIAT/TSBF) and the Center for Microbial Ecology (Michigan State University) for the financial support; the Capes foundation for the doctorate and “sandwich” fellowships provided to Ederson da C. Jesus; Dr. E. Durant McArthur from the Rocky Mountain Research Station and Dr. Mike T. Friggens and Scott L. Collins from the Sevilleta LTER and University of New Mexico for collecting the soil samples in the Great Basin Experimental Range and Sevilleta and for helping with information about the collection sites; all colleagues from the Center for Microbial Ecology and from the Soil Science Department of the Federal University of Lavras, especially those who collaborated with their support, suggestions and who introduced me to the techniques presented herein.

## SUMMARY

<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>CHAPTER 1</b> .....	<b>1</b>
<b>GENERAL INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPTER 2</b> .....	<b>5</b>
INTRODUÇÃO .....	5
Limitação do cultivo em meios de cultura para estudos de ecologia de bactérias	6
O solo como um hábitat para microorganismos e limitações para o estudo de comunidades microbianas no solo .....	11
Extração de DNA.....	13
A reação em cadeia da polimerase.....	16
Técnicas moleculares para a avaliação da diversidade bacteriana: .....	18
Determinação da porcentagem de guanina e citosina .....	18
Técnicas de fingerprinting ou perfis de comunidades .....	22
Polimorfismo de fragmentos de restrição terminais (T-RFLP) .....	24
Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) e eletroforese em gel com gradiente de temperatura (TGGE) .....	29
Polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP).....	33
Análise do Espaçador Intergênico do RNA Ribossomal (RISA) e Análise Automatizada do Espaçador Intergênico do RNA Ribossomal (ARISA) .....	35
Bibliotecas genômicas.....	38
Metagenômica.....	42
PCR quantitativa .....	43
Microarranjos.....	46
Emprego de técnicas moleculares para o estudo de comunidades microbianas do solo no Brasil .....	49
Considerações finais.....	56
Referências Bibliográficas.....	58
<b>CHAPTER 3</b> .....	<b>75</b>
1 INTRODUCTION.....	77
2 MATERIAL AND METHODS .....	78
3 RESULTS .....	86
4 DISCUSSION.....	102
5 ACKNOWLEDGMENTS .....	110
6 REFERENCES .....	110

<b>CHAPTER 4.....</b>	<b>123</b>
1 INTRODUCTION.....	125
2 MATERIAL AND METHODS .....	126
3 RESULTS.....	133
4 DISCUSSION.....	146
5 ACKNOWLEDGMENTS .....	151
6 REFERENCES .....	152
<b>CHAPTER 5.....</b>	<b>159</b>
CONCLUDING REMARKS.....	159
<b>ANNEXES.....</b>	<b>163</b>

## RESUMO

JESUS, Ederson da Conceição. **Estrutura e diversidade de comunidades bacterianas nos solos de diferentes sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental por análises de T-RFLP e sequenciamento.** 2008. 170p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

O objetivo da primeira parte deste trabalho foi verificar o efeito de seis sistemas de uso da terra (SUTs) da região do Alto Solimões, Amazonas, Brasil, sobre a diversidade de bactérias do solo. Os sistemas estudados foram: pastagem, culturas, agrofloresta, capoeira nova, capoeira velha e floresta virgem de terra firme, escolhidos de modo a se obter um gradiente de intensidade de utilização da terra. DNA foi extraído das amostras de solo e a composição e diversidade da comunidade foram avaliadas com T-RFLP, clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA. Os dados foram analisados com técnicas de análise multivariada e índices de diversidade foram calculados. Comunidades com alta diversidade foram observadas em todos os SUTs, sendo que as comunidades de pastagem foram as mais diversas, e as principais diferenças foram verificadas na estrutura das comunidades. Essas diferenças estavam relacionadas a mudanças nos atributos do solo as quais, por sua vez, se relacionaram com o uso da terra. A estrutura das comunidades mudou significativamente ao longo de gradientes de saturação de bases,  $[Al^{+3}]$  e pH. Cerca de 31% da variação observada nas comunidades estudadas se deve aos atributos do solo, demonstrando que a distribuição das bactérias nessas comunidades está relacionada a fatores edáficos, e indicando que o uso da terra, através de sua influência nos atributos do solo, foi um fator significativo. Diferenças claras foram observadas na composição das comunidades. Acidobacteria e Proteobacteria foram os filos mais abundantes e grupos dentro desses filos se distribuíram diferencialmente entre os sistemas de uso. Maior número de seqüências de Bacteroidetes foi encontrado em áreas de cultivo, enquanto maior número de seqüências de Firmicutes e Actinobacteria foi encontrado nas áreas de Floresta e Capoeira. A maioria das seqüências apresentou maior identidade com seqüências de organismos não cultivados. Conclui-se com base nesses dados que o uso da terra foi um fator importante na diferenciação das comunidades e que estas mudanças estão ligadas a alterações nos atributos do solo. Na segunda parte, o objetivo foi comparar a diversidade e estrutura e diversidade das comunidades bacterianas da Amazônia e de ecossistemas agrícolas e naturais dos Estados Unidos, incluindo amostras de solo de ambientes semi-áridos. Comunidades com alta diversidade foram encontradas

em todos os ambientes, incluindo solos com pH baixo e intermediário, e as principais diferenças foram observadas na estrutura da comunidade. Esta mudou significativamente ao longo de gradientes de diferentes atributos do solo, especialmente pH e  $[K^+]$ . Embora várias comunidades não pudessem ser ordenadas com base na sua diversidade, as comunidades de pastagem e uma das comunidades de ambiente semi-árido apresentaram-se como sendo as mais diversas. Conclui-se que comunidades bacterianas com alta diversidade também podem ser encontradas na Amazônia e que a composição das comunidades estudadas está relacionada a fatores edáficos.

---

\*Comitê Orientador: Fátima Maria de Souza Moreira - UFLA (Orientadora), James M. Tiedje – Michigan State University (Co-orientador), Terence L. Marsh – Michigan State University (Co-orientador).



## ABSTRACT

JESUS, Ederson da Conceição. **Bacterial community diversity and structure in soils from different land use systems of the Western Brazilian Amazon evaluated by T-RFLP and sequencing analyses.** 2008. 170p. Thesis (Doctorate in Soil Science) - Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil.\*

The aim of the first part of this work was to evaluate the effect of six different land use systems (LUS) from the Alto Solimões Region, Amazonas State, Brazil, on the structure and diversity of soil bacterial communities. The studied LUS were Pasture, Crop, Agroforestry, Young Secondary Forest, Old Secondary Forest and Primary Forest. These were chosen with the intention of composing a gradient of land use intensification. DNA was extracted from soil samples and community composition and diversity were explored by using the 16S rRNA gene by T-RFLP, cloning and sequencing. Data were analyzed with multivariate techniques and diversity indices were also calculated. Highly diverse communities were found in all LUS and Pasture communities were ranked as the most diverse. The main differences between bacterial communities were observed in their structure. We found that these differences were related to changes in the soil attributes which, in turn, were correlated to land use. The structure of communities changed significantly along gradients of base saturation,  $[Al^{+3}]$  and pH. Soil attributes accounted for about 31% of the variation of the studied communities, showing that the distribution of bacteria is linked to edaphic factors, and indicating that land use, through its influence on soil attributes, was a significant factor determining the structure of bacterial communities in the studied soils. Clear differences were observed in community composition. Acidobacteria and Proteobacteria were the most abundant phyla and groups inside them were distributed differently among the LUS. A larger number of Bacteroidetes sequences were observed in cultivated sites. In turn, Firmicutes and Actinobacteria sequences were more numerous in the Forest and Old Secondary Forest. The majority of the sequences matched with sequences of uncultured bacteria. We can conclude that land use was an important factor to differentiation among bacterial communities and that those differences are linked to changes in the soil attributes. In the second part, we aimed to compare the structure and diversity of bacterial communities from the Amazon and agricultural and natural environments of the United States, including samples from semi-arid environments. Highly diverse communities were found in all environments, including soils with low to intermediate pH, and the main differences were observed in community structure. The structure of communities changed significantly along gradients of different soil attributes, especially pH

and  $[K^+]$ . Although several communities could not be ranked regarding diversity, Pasture communities and one of the communities from semi-arid environment soil were considered as the most diverse of all. We can conclude that highly diverse bacterial communities can be found in Amazonian soils and that differences in community composition are related to edaphic factors.

---

\*Guidance Committee: Fátima Maria de Souza Moreira - UFLA (Major Professor), James M. Tiedje – Michigan State University (Co-advisor), Terence L. Marsh – Michigan State University (Co-advisor).

## **CHAPTER 1**

### **GENERAL INTRODUCTION**

The Amazonian forest is known for its large biological diversity but yet little is known about the diversity of its soil microbial communities. Some studies indicate that a large soil bacterial diversity is present in Amazon soils, though a recent study indicates that bacterial communities with low diversity can be found. Those bacteria may be involved in several functions that are important for ecosystem maintenance, such as nitrogen fixation, organic matter decomposition, nitrification, denitrification and xenobiotic degradation, and which are a consequence of the great diversity of bacterial communities. Changes in these communities caused by anthropic activities, such as agriculture, may have negative consequences and, consequently, influence on the ecosystem health. Agriculture is a reality in the Amazon and its effects on soil bacterial communities still have not been completely understood. Understanding how land use affects bacterial communities is important to design management practices that help preserve microbial diversity as well as to benefit from it. Within this context, the objective of our work was to study the structure and diversity of bacterial communities in Amazon soils as well as to evaluate the impact of land use on these communities.

This work is part of the Conservation and Sustainable Management of Below Ground Biodiversity (BGBD) project, which is implemented by the United Nations Programme in seven countries, namely Brazil, Ivory Coast, India, Indonesia, Kenya, Mexico and Uganda. Several groups of soil organisms have been studied including soil fauna, mycorrhizal fungi, Leguminosae-

nodulating bacteria, pathogenic fungi as well as soil processes carried out by these organisms. In Brazil, researchers from UFLA, UFAM, INPA, Embrapa, Unb, CENA and FURB participate of the project. In UFLA we have been responsible for the bacterial diversity studies, including Leguminosae-nodulating bacteria, associative diazotrophs and general soil bacteria.

The chosen site in Brazil is one of the main hotspots of Amazonian biodiversity and the homeland of remaining indigenous peoples, which practice slash-and-burn agriculture. Some pasture sites may also be found in the region as a consequence of government policies implemented during the 1970's. The rate of deforestation in the region is low as a consequence of several factors, mainly low population density and the difficulty of access due the absence of roads linking the region to other regions of the country. BGBD studies aim to contribute to the knowledge of Amazonian below-ground biodiversity, evaluate the impact of agricultural practices and propose new alternatives for land use.

## **OBJECTIVES**

The main objectives of this work were:

1. To assess the diversity of soil bacterial communities in six land use systems in Amazon by 16S rRNA gene T-RFLP and sequencing analyses;
2. To verify whether and how soil cultivation influences the structure of these communities;
3. To identify which environmental factors are linked to differences in the structure and diversity of the bacterial communities.

## **HYPOTHESES**

The following hypotheses were tested in our work (only the null hypothesis is presented):

**1. Community structure and diversity do not change as a result of land use.**

We tested whether significant differences in bacterial community structure can be observed between land use systems. If this hypothesis is true, communities would have similar composition. Similarly, we tested whether land use also affected bacterial diversity. Moreover, we looked for factors that would be linked to land use and changes in bacterial community structure in order to determine how land use could affect those communities.

**2. Differences in community structure are not related to geographic distance.**

**3. Differences in community structure are not related to changes in the soil attributes.**

Besides land use, other factors can influence on bacterial community structure and diversity. For this reason, we tested whether geographic distance and soil attributes, as well as interactions between them and with land use, affect community structure. If hypotheses (2) and (3) are true, communities from different geographic locations and under different soil conditions would present similar structure. Geographic distance and soil attributes would not contribute significantly to the variation among bacterial communities.

**4. Land use intensification does not reduce bacterial diversity.**

Several scientists believe that the intensification of human impacts on the environment (e.g., land use) reduces biological diversity. If this hypothesis is true for bacterial communities, we expect bacterial diversity to be higher in the Primary Forest than in agricultural environments.

**5. Community structure and diversity are the same in soils from Amazon, Michigan, Sevilleta (NM) and Great Basin Experimental Range (UT).**

It was found recently that soil bacterial communities from semi-arid environments in the United States are more diverse than communities in soils

from the Peruvian Amazon, as discussed in the fourth chapter. We compared some of those communities to communities from Brazil. We tested whether significant differences in bacterial community structure are observed between soils from different geographic locations in Brazil and in the United States. If this hypothesis is true, communities would present similar composition. Similarly, we looked for significant differences in bacterial diversity as well as for factors that would be linked to changes in bacterial community structure.

This thesis was divided into five chapters, including the present chapter, which gives a brief introduction to our work. All chapters were written in English, except the second chapter, which was written in Portuguese. The second chapter includes a literature review about molecular techniques used to study bacterial communities. These techniques as well as their use for Brazilian research groups are addressed. The third chapter addresses the main objective of our work, which is to study the structure and diversity of bacterial communities in the Western Brazilian Amazon as affected by land use. The Fourth chapter presents a comparison between soil bacterial communities from Amazon and communities from United States, including communities from semi-arid environments (Utah and New Mexico) as well as from natural and agricultural areas in Michigan. Finally, the fifth chapter presents general remarks and conclusions.

## CHAPTER 2

### MÉTODOS MOLECULARES PARA O ESTUDO DE COMUNIDADES DE BACTÉRIAS DO SOLO

Ederson da Conceição Jesus & Fátima Maria de Souza Moreira

Departamento de Ciência do Solo-Universidade Federal de Lavras C.P. 3037,  
Lavras MG – Brasil,  
CEP 37200-000, e-mail: edersonjesus@gmail.com, [fmoreira@ufla.br](mailto:fmoreira@ufla.br)

#### INTRODUÇÃO

Acredita-se que a maior diversidade de organismos em um ecossistema seja responsável por sua maior **estabilidade** e **resiliência**, necessárias para que esse se apresente como um sistema sustentável. Os microorganismos do solo (e.g. bactérias, arqueias, fungos, algas-verdes e protozoários) assumem papel importante para essa sustentabilidade, visto que são responsáveis por atividades essenciais para o bom funcionamento dos ecossistemas, tais como a decomposição da matéria orgânica, a disponibilização de nutrientes, incluindo a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a agregação das partículas do solo e a degradação de xenobióticos, dentre outras (Moreira & Siqueira, 2006). Essas funções são reflexo da grande diversidade de organismos existentes no solo, notadamente bactérias, visto que muitos processos biológicos estão restritos a esse grupo. Mudanças na estrutura das comunidades biológicas do solo podem afetar as funções por elas realizadas e, conseqüentemente, a sustentabilidade do ecossistema. Dessa forma, avaliar o impacto de mudanças no ambiente do solo sobre populações e comunidades de microorganismos torna-se importante não só

para o seu manejo, mas também para o delineamento de práticas que favoreçam a funcionalidade dos agroecossistemas e a produtividade agrícola sustentável.

Várias abordagens são empregadas para se realizar essa avaliação, tais como a determinação da biomassa microbiana, a medição da atividade bioquímica, o cultivo dos organismos e o emprego de técnicas de biologia molecular para o acesso à diversidade das **populações** e **comunidades** de interesse, especialmente do Domínio Bacteria em Prokaryotae (doravante denominadas bactérias), sendo essas últimas o foco deste capítulo.

#### **LIMITAÇÃO DO CULTIVO EM MEIOS DE CULTURA PARA ESTUDOS DE ECOLOGIA DE BACTÉRIAS**

O cultivo consiste no crescimento do microorganismo em laboratório, em meio de cultura contendo os nutrientes necessários e sob condições químicas e físicas ajustadas para faixas ótimas. Os microorganismos de interesse podem ser obtidos pela utilização de meios de cultura e condições ambientais seletivos, os quais favorecem o crescimento de grupos microbianos específicos. Uma vez purificados, de modo a garantir que não haja a mistura de organismos diferentes, esses podem ser armazenados para estudos posteriores. Ter um organismo cultivado em laboratório é necessário para que avaliações de sua morfologia, genética, fisiologia e metabolismo sejam realizadas, sendo importante para a compreensão do papel desse na comunidade, bem como de suas potencialidades para aplicação biotecnológica. Contudo, no caso das bactérias, ainda não é possível cultivar a maioria das espécies, o que limita o acesso à diversidade dessas comunidades.

Estima-se que menos de 1% das espécies de bactérias possam ser cultivadas com as técnicas atualmente disponíveis (Amman et al., 1995). Esse fato foi constatado pelo desenvolvimento de técnicas independentes do cultivo para o estudo de comunidades microbianas, as quais permitiram a detecção da



elevada diversidade de espécies de bactérias no solo. Até recentemente foram descritos 52 filos de bactérias (Domínio Bacteria) com base na utilização de técnicas moleculares (Figura 2.1), sendo que desses, vinte e seis filos ainda não possuem representantes cultivados (Rappé & Giovannoni, 2003). No Domínio Archaea, o filo Korarchaeota compreende bactérias não cultiváveis, enquanto os demais são cultiváveis (Crenarchaeota, Euryarchaeota, Nanoarchaeota). Giovannoni (2004) apresenta as seguintes hipóteses como possíveis explicações para a inabilidade de se cultivar várias espécies de microorganismos: esses apresentam crescimento muito lento e/ou não atingem altas densidades em meios de cultura, de modo que não são detectados nos procedimentos de cultivo; eles exigem condições muito específicas para seu crescimento, pouco prováveis de serem obtidas por experimentação; eles requerem interação com outros organismos em consórcios; e contaminantes-traço em reagentes de laboratório são tóxicos para os microorganismos. Assim, métodos baseados em cultivo subestimam a diversidade de comunidades bacterianas e passam uma imagem distorcida das mesmas (Hugenholtz et al., 1998), uma vez que não proporcionam a amostragem da grande maioria das espécies que podem ocorrer no solo. Técnicas de biologia molecular têm sido empregadas amplamente para avaliar populações e comunidades de bactérias, permitindo o acesso à diversidade que não é revelada pelo cultivo.

Estimativas iniciais apontavam para 10.000 espécies de bactérias em 100 g de solo (Torsvik, 1994). Porém, estimativas recentes indicam números muito maiores. Gans et al. (2005) empregaram novos recursos computacionais para analisar os dados de hibridização DNA-DNA de Sandaa et al. (1999) e estimaram que  $8,3 \times 10^6$ ,  $6,4 \times 10^4$  e  $7,9 \times 10^3$  espécies de bactérias estavam presentes em 10 gramas de solo não contaminado com metal, contaminado com baixo teor de metais e contaminado com alto teor de metais, respectivamente, quando as estimativas anteriores foram de 16.000, 6.400 e 2.000 genomas de

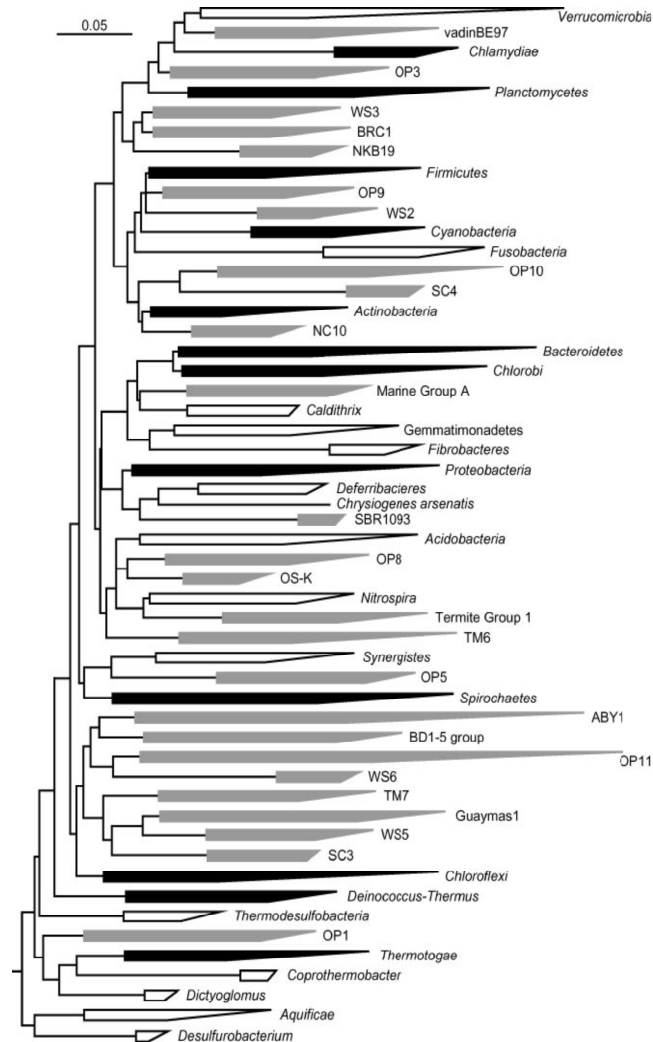


FIGURA 2.1 Árvore mostrando as relações evolutivas entre os principais filos do domínio Bacteria, construída com base na análise comparativa de cerca de 600 seqüências do gene 16S rRNA (Rappé & Giovannoni, 2003). Os ramos pretos mostram os 12 filos originalmente descritos por Woese (1987), os ramos brancos mostram os 14 filos com representantes cultivados desde 1987 e os ramos cinza mostram os 26 candidatos a filos que não contêm nenhum organismo cultivado. A escala corresponde a 0.05 substituições de nucleotídeos por posição.

bactérias por grama de solo, respectivamente. Recentemente, Roesch et al. (2007) apresentaram estimativas de aproximadamente 52.000 unidades taxonômicas operacionais definidas com base em similaridade de sequências do gene 16S rRNA, um valor abaixo do máximo sugerido por Gans et al. (2005). Essa grande riqueza de bactérias existente nos solos constitui-se em um empecilho para a avaliação precisa da diversidade. Em muitos casos as curvas de coleta construídas para comunidades de bactérias do solo não atingem a assíntota (ponto no gráfico onde uma curva se aproxima de um platô) de modo que uma estimativa adequada do número de espécies presentes não pode ser realizada com boa precisão (Borneman & Triplett, 1997; Hughes et al., 2001; Tringe et al., 2005).

Por exemplo, Hughes et al. (2001) compararam comunidades de diferentes organismos entre si com base em curvas de acumulação e verificaram que a maior diversidade foi encontrada em comunidade de bactérias de solo da Amazônia (Figura 2.2). Uma maior concavidade da curva indica que a comunidade em questão foi melhor amostrada do que outra com curva de menor concavidade. Desse modo, observa-se na Figura 2.2 que as comunidades de plantas e pássaros foram bem amostradas, enquanto a comunidade de bactérias do solo, não.

Contudo, novas tecnologias como, por exemplo, o pirosequenciamento, estão permitindo a obtenção de um grande número de sequências em relativamente pouco tempo, uma limitação do método Sanger de sequenciamento (Margulies et al., 2005). Deste modo, um grande número de sequências pode ser gerado, permitindo uma estimativa mais acurada da diversidade de bactérias existente em um dado ambiente. O pirosequenciamento foi utilizado por Roesch et al. (2007) para estudar a diversidade de bactérias em solos agrícolas e cultivados. Esses autores estimaram que, no nível mais alto de

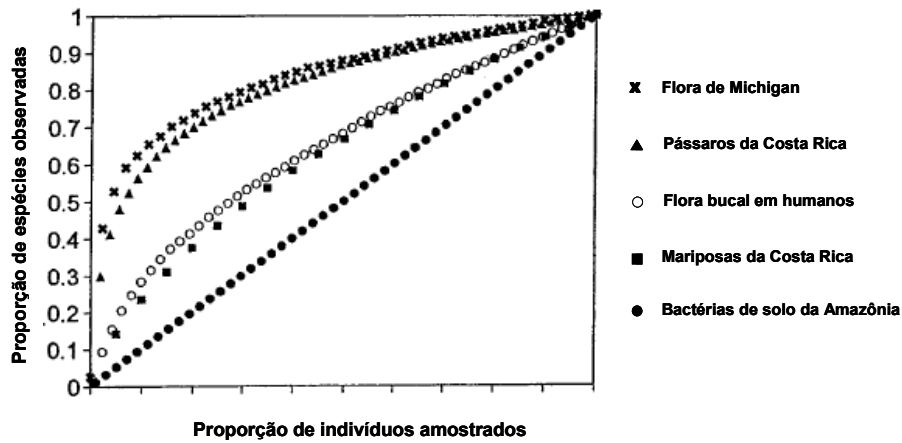


FIGURA 2.2 Comparação entre curvas de acumulação construídas para diferentes tipos de organismos (Hughes et al. 2001). Reproduzido com autorização do autor e da Sociedade Americana de Microbiologia.

resolução, isto é, 0% de dissimilaridade entre sequências do gene 16S rRNA, quase 52.000 unidades taxonômicas operacionais estavam presentes.

Existe uma ampla gama de técnicas da biologia molecular (Tiedje et al., 1999; Hill et al., 2000). Algumas delas têm passos em comum, tais como a extração de DNA das células diretamente do solo e a amplificação de genes **marcadores** por reação em cadeia da polimerização (Polymerase Chain Reaction-PCR). Este capítulo tem por objetivo apresentar uma descrição das principais metodologias que estão sendo empregadas e discutir suas vantagens, desvantagens e perspectivas de sua utilização para o estudo da diversidade de bactérias do solo.

## **O SOLO COMO UM HÁBITAT PARA MICROORGANISMOS E LIMITAÇÕES PARA O ESTUDO DE COMUNIDADES MICROBIANAS NO SOLO**

O solo pode ser dividido em três fases – sólida, líquida e gasosa – as quais interagem entre si de forma dinâmica. A parte sólida consiste nas partículas minerais do solo, as quais interagem entre si formando partículas maiores conhecidas como agregados. As partículas minerais possuem constituição química variada e podem ser classificadas como areia, silte e argila, com base no seu tamanho (diâmetros  $<0,002$  mm, entre 0,002 e 0,05 mm e entre 0,05 e 2 mm, respectivamente). Os agregados, por sua vez, são classificados como microagregados (diâmetro  $<250$  mm) e macroagregados (diâmetro  $>250$  mm). A parte líquida consiste na solução do solo, a qual é constituída por água e materiais nela dissolvidos. A parte gasosa consiste no ar existente nos poros, o qual apresenta características distintas do ar da atmosfera, devido à atividade biológica (Hillel, 1982; Moreira & Siqueira, 2006).

A interação entre essas três fases determina um ambiente complexo e heterogêneo, constituído por vários microsítios (microhabitats) com características físicas, químicas e biológicas diferenciadas. Essa diversidade de habitats propicia que organismos adaptados a condições completamente diferentes possam conviver em um mesmo ambiente, refletindo-se na grande diversidade biológica do solo. Por exemplo, é possível encontrar bactérias aeróbias e anaeróbias vivendo em um mesmo solo, devido à existência de regiões com condições aeróbias e anaeróbias a distâncias relativamente pequenas (Madigan & Martinko, 2006). As bactérias, que têm geralmente diâmetro menor que 0,5 mm, podem estar na matéria orgânica, nos poros e no interior dos agregados (Figura 2.3), bem como na rizosfera de plantas e associadas com outros organismos, tais como fungos.

A matriz do solo é constituída por minerais e moléculas orgânicas, os quais interagem com os íons, moléculas e células existentes na solução do solo.

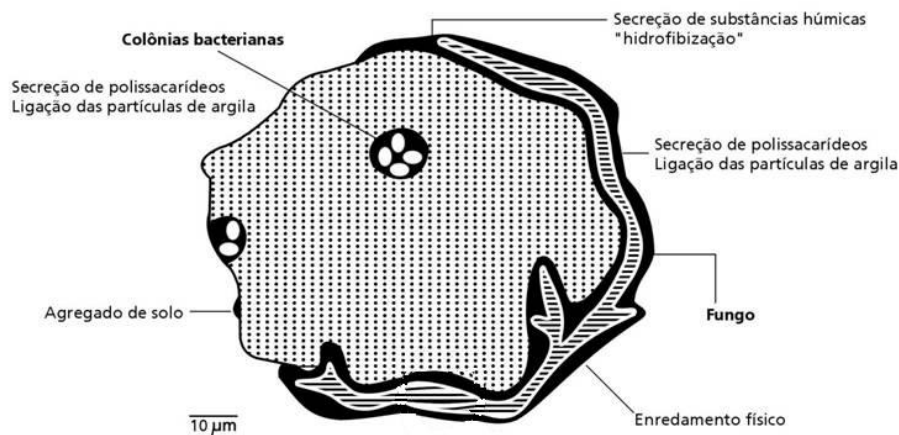


FIGURA 2.3 Esquema de agregado do solo, mostrando a presença de fungos e bactérias, bem como de material de origem biológica, tais como secreções de polissacarídeos e substâncias húmicas (Moreira & Siqueira, 2006).

A alta superfície disponível para interação é função da presença de minerais de argila, óxidos de Fe e Al e húmus, que têm tamanho extremamente reduzido e apresentam-se com carga variável no solo (Kampf & Curi, 2000a; Kampf & Curi, 2000b; Huang et al., 2002). Macromoléculas tais como o DNA, o RNA e as proteínas também apresentam-se carregadas e interagem com essa matriz. Isso tem implicações importantes para a extração de ácidos nucleicos das células diretamente do solo, como será comentado a seguir. A adsorção de ácidos nucleicos às argilas do solo pode reduzir consideravelmente a eficiência da extração e os ácidos orgânicos podem atuar como contaminantes dos ácidos nucleicos extraídos e interferir em sua qualidade. As partículas sólidas também podem dificultar o rompimento das células presentes no solo para liberação de DNA e RNA, principalmente daquelas presentes no interior de agregados.

## EXTRAÇÃO DE DNA

A extração adequada de **ácidos nucleicos** das células presentes em amostras ambientais é uma etapa crucial, visto que qualquer erro cometido nessa etapa se refletirá em etapas posteriores da análise dessas moléculas (Zhou et al., 1996). Existem duas estratégias para a obtenção de DNA considerando-se amostras ambientais: indireta e direta. Na extração indireta, as células são separadas da matriz do solo e utilizadas para extração do material genético (Duarte et al., 1998; Sandaa et al., 1999). A separação das células garante que apenas ácidos nucleicos de procariotos serão obtidos e que, além disso, esses contenham menos contaminantes. Contudo, o manuseio de um grande número de amostras é dificultado. Também, células fortemente retidas às partículas do solo não são separadas, de modo que a comunidade pode não ser bem representada na amostra extraída.

Na extração direta, trabalha-se com o rompimento das células *in situ*, isto é, diretamente no solo (Insam, 2001; Saleh-Lakha et al., 2005). As células podem ser rompidas por maceração, sonificação, pérolas de vidro, aquecimento e atividade de enzimas, sendo que cada método difere na sua capacidade de rompimento das células e na qualidade do material recuperado. O rompimento adequado das células é importante para que o DNA e RNA recuperados sejam representativos da comunidade a ser estudada. Bactérias gram-positivas são mais resistentes ao rompimento do que bactérias gram-negativas devido à constituição diferenciada de sua parede celular. Essas possuem uma espessa camada de peptidoglicano na parte externa da membrana citoplasmática enquanto as bactérias gram-negativas possuem uma camada fina de peptidoglicano entre a membrana plasmática e uma camada de lipolissacarídeos e proteínas (Figura 2.4). Desse modo, tratamentos diferenciados, tais como a maceração e a utilização de lisozimas, são necessários para que a parede de bactérias gram-positivas seja rompida. Métodos como a quebra mecânica por pérolas de vidro

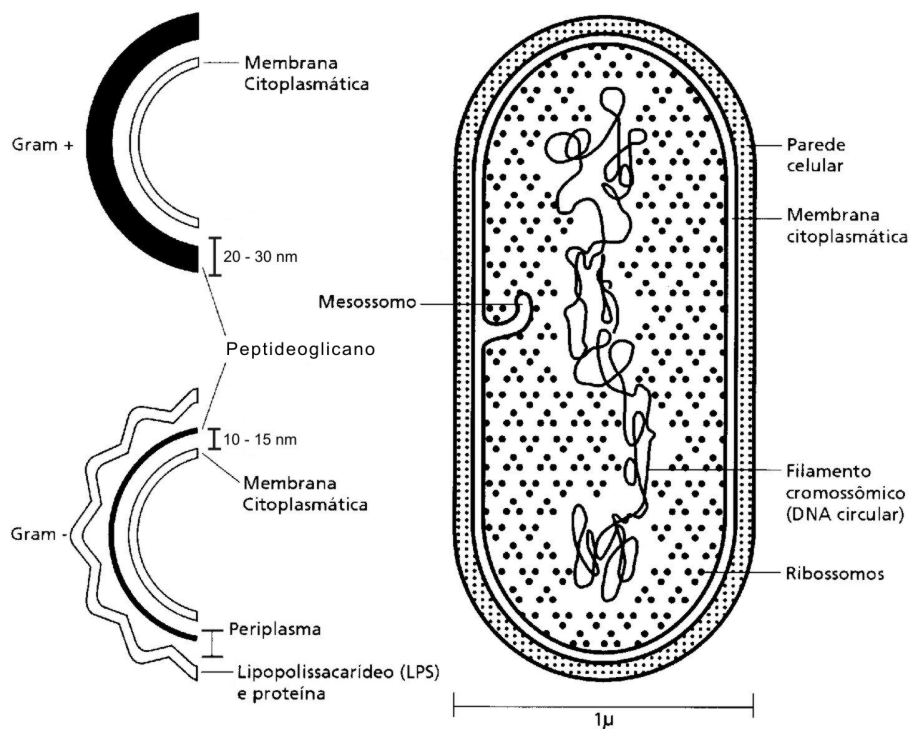


FIGURA 2.4 Esquema mostrando como é a parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas. (a) Parede celular de bactérias gram-positivas; (b) Parede celular de bactérias gram-negativas; (c) Célula de *Escherichia coli* mostrando o único DNA cromossômico circular característico de todas as bactérias que, no caso desta espécie, possui  $4 \times 10^6$  pares de base.

são mais eficientes no rompimento das células e na dispersão das partículas de solo (Smalla et al., 1993; Moré et al., 1994) porém propiciam maior quebra do DNA, o que é uma desvantagem quando DNA de alto peso molecular é necessário. Contudo, esse tratamento é bastante utilizado e considerado um dos mais eficientes para extração (Yeates et al., 1998). Outro tratamento eficiente é a adição de uma etapa de maceração com N líquido e resfriamento-aquecimento, a qual aumenta a extração de DNA de bactérias gram-positivas e aumenta em 5 a 6 vezes a quantidade de DNA extraída comparada à não-adição desse tratamento



(Zhou et al., 1996). Quando associada à utilização de **lisozimas**, permite a obtenção de DNA de alto peso molecular<sup>1</sup>.

A extração direta evita o problema da representatividade, porém vários outros fatores influenciam em sua eficiência e na qualidade do DNA extraído. Ácidos orgânicos são extraídos juntamente com o DNA e podem interferir em etapas posteriores do trabalho com ácidos nucleicos. Também, o DNA pode estar adsorvido às argilas do solo, de modo que a eficiência de extração é reduzida (Zhou et al., 1996; Frostegard et al., 1999). Portanto, o tratamento com dispersantes e a separação de ácidos nucleicos dos contaminantes orgânicos são etapas essenciais para garantir a extração adequada de DNA de amostras de solo.

A quantidade de solo utilizada para a extração de DNA também é um ponto importante a ser considerado. Estudos recentes de comunidades microbianas do solo utilizaram, geralmente, até um grama de solo para extração. Contudo, essa quantidade pode não ser representativa, conforme indicado por Stres et al. (2004). Esses autores verificaram que a similaridade de perfis de RFLP do gene *nosZ*, utilizado como marcador específico para bactérias desnitrificadoras, aumentou proporcionalmente com a quantidade de solo utilizado para extração de DNA. Maior diferença foi observada entre amostras muito pequenas (0,25 e 0,5 g). A diferença foi mínima entre amostras com quantidades de solo superiores a três gramas, de modo que essa foi considerada como a quantidade ótima de solo para o estudo em questão. Com base nesse resultado, recomenda-se utilizar a maior quantidade de solo possível, de modo a garantir uma boa representatividade da comunidade.

---

<sup>1</sup> S. Gantner, comunicação pessoal.

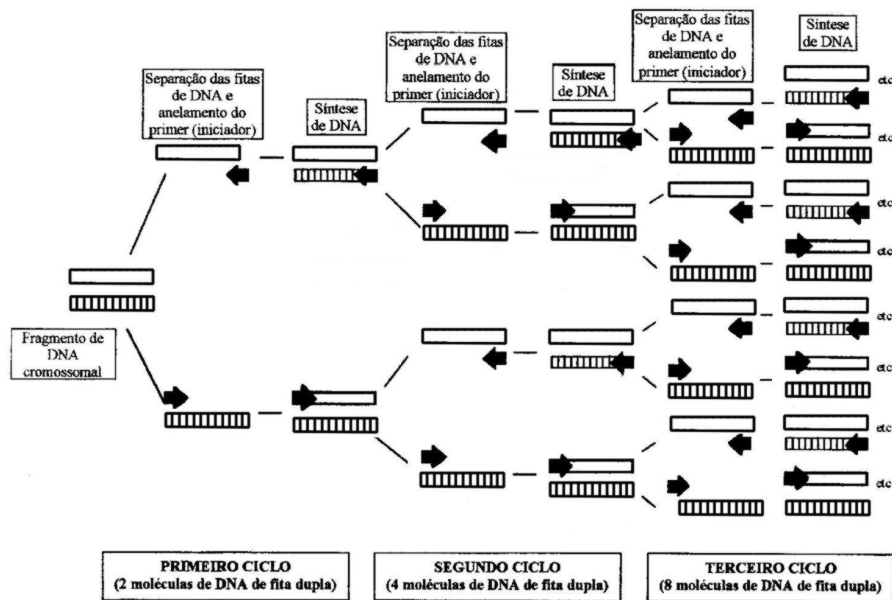


FIGURA 2.5 Esquema mostrando as etapas iniciais da reação em cadeia da polimerase *in vitro* (PCR) (Adaptado de Alberts et al., 1994).

#### A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste na amplificação *in vitro* de seqüências de DNA de interesse com o auxílio de iniciadores específicos (Mullis et al., 1986) e o seu desenvolvimento proporcionou um grande avanço no estudo da taxonomia de bactérias uma vez que possibilitou a utilização mais intensiva de **cronômetros moleculares**, tais como o **gene 16S rRNA** (Woese, 1989). Explicando resumidamente, os reagentes necessários para a reação – tampão, MgCl<sub>2</sub>, desoxirribonucleotídeos, iniciadores, a enzima Taq polimerase, a seqüência de DNA alvo (“template” ou molde) e água – são misturados e submetidos a ciclos de temperatura em uma máquina conhecida como termociclador, os quais permitem a ocorrência da reação (Figura 2.5). Primeiramente, a reação é aquecida a 94-95°C para abertura da dupla fita de

DNA. Posteriormente, a temperatura é diminuída para 55-65°C para a ligação dos iniciadores às fitas do DNA alvo (a temperatura certa dependerá do iniciador utilizado). Por último, a temperatura é elevada para 72°C, que é a temperatura ótima para o funcionamento da enzima Taq DNA polimerase, a qual é responsável pela cópia do DNA. Em geral, 20-40 ciclos são suficientes para se obterem as quantidades necessárias do fragmento de DNA alvo, dependendo da finalidade do estudo. No final da reação, milhões de cópias da seqüência-alvo são obtidas.

Embora a PCR esteja sujeita a erros tais como a formação de **quimeras** e amplificação preferencial de seqüências, de modo que a precisão das técnicas baseadas em PCR é afetada (Suzuki & Giovannoni, 1996; Polz & Cavanaugh, 1998; Suzuki et al., 1998), ela é amplamente utilizada. Existem vários procedimentos empregados para a redução desses erros tais como hotstart PCR, PCR recondicionante e touchdown PCR, bem como programas para a detecção de quimeras (Acinas et al., 2005). A utilização desses procedimentos é importante para se evitar a amplificação de seqüências inespecíficas bem como considerar quimeras como sendo seqüências de organismos verdadeiros.

Adicionalmente, deve-se atentar para a especificidade dos iniciadores utilizados na reação. Esses podem ser mais ou menos específicos para certos grupos de bactérias de acordo com os objetivos do estudo. Quando grupos específicos de bactérias são o alvo, iniciadores específicos são utilizados. Exemplos da aplicação desses iniciadores são os trabalhos de Silva et al. (2003) e Evans et al. (2004b), em que esses autores utilizaram iniciadores específicos para amplificação do gene 16S rRNA de bactérias dos gêneros *Paenibacillus* e *Pseudomonas*, respectivamente. Quando a composição geral da comunidade é o alvo, iniciadores universais são utilizados. Por universais, entende-se que esses podem ser utilizados para amplificar seqüências provenientes de uma variedade de organismos diferentes. Porém, esse é um conceito teórico, pois não existe um

iniciador estritamente universal. Para que a amplificação de genes de diferentes grupos seja alcançada, esses iniciadores podem ser degenerados, ou seja, ter diferentes bases numa mesma posição, de modo a acomodar a variação de seqüências existente entre bactérias. Mesmo iniciadores considerados universais diferem entre si na capacidade de detecção da diversidade. Os iniciadores 27F e 1492R (Lane, 1991) são muito utilizados para estudos com bactérias, porém Marchesi et al. (1998) apresentam outro conjunto de iniciadores – 63F e 1387R - considerado capaz de amplificar um número mais diverso de seqüências. Exemplos da aplicação de iniciadores universais são os trabalhos de Piza et al. (2004), Silveira et al. (2006) e Pereira et al. (2006), em que esses autores utilizaram genes universais para amplificação de seqüências do gene 16S rRNA de comunidades de bactérias de solo.

#### **TÉCNICAS MOLECULARES PARA A AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE BACTERIANA:**

Diversas técnicas podem ser empregadas para avaliar a diversidade de bactérias do solo (Figura 2.6). Essas diferem na sua capacidade de resolução para identificar os membros da comunidade (Tiedje et al., 1999) e podem ser utilizadas isoladamente ou em conjunto, de acordo com os objetivos pretendidos. As principais técnicas empregadas para o estudo da ecologia bacteriana são abordadas a seguir.

#### **DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE GUANINA E CITOSINA**

Gêneros de bactérias podem ser caracterizados com base no conteúdo de guanina e citosina presentes em seu DNA total de modo que a porcentagem desses nucleotídeos no DNA (%G+C) pode ser um indicativo da **identidade filogenética** de uma bactéria. Essa característica já é adotada, de longa data, na taxonomia, sendo utilizada em livros clássicos, por exemplo, o *Bergey's Manual*

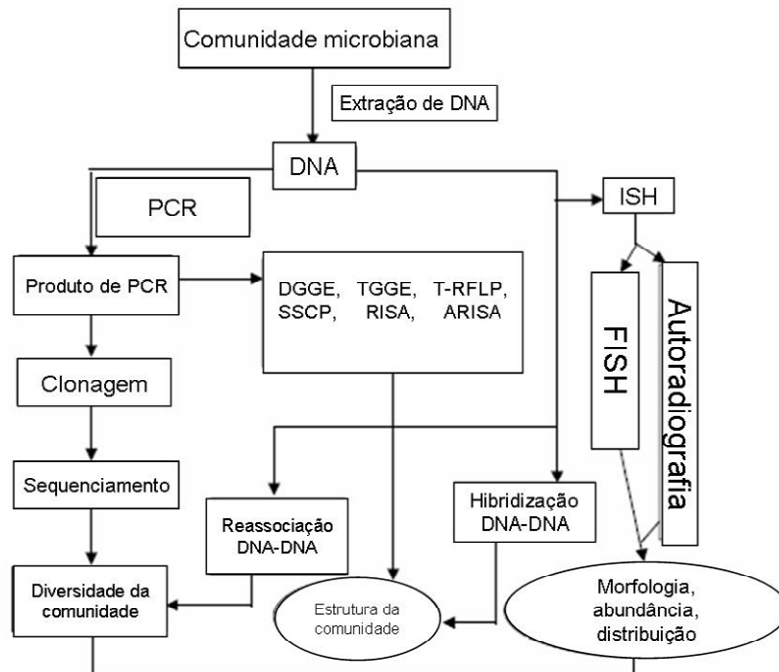


FIGURA 2.6 Técnicas moleculares utilizadas para o estudo de comunidades de bactérias (Dubey et al., 2006). PCR, reação em cadeia da polimerase; DGGE, eletroforese em gel de gradiente desnaturante; TGGE, eletroforese em gel de gradiente de temperatura; T-RFLP, polimorfismo de fragmentos de restrição terminais; SSCP, polimorfismo conformacional de fita simples; RISA, Análise do espaçador intergênico ribossomal; ARISA, Análise automatizada do espaçador intergênico ribossomal; ISH, hibridização *in situ*; FISH, hibridização *in situ* com fluorescência. Reproduzido com permissão de Elsevier.

of *Systematic Bacteriology* e o *The Prokaryotes*. Determinados gêneros de bactérias possuem uma elevada %G+C (60-75%), enquanto outros apresentam uma baixa porcentagem, sendo essa característica, inclusive, relacionada à fisiologia do organismo (Santo Domingo et al., 1998). Como exemplos podem-

se citar as classificações dentro do filo Firmicutes onde esse pode ser dividido em bactérias gram-positivas com alta %G+C (e.g. *Actinomyces* e *Streptomyces*), (maior que 55 mol %), e com baixa %G+C (e.g. *Clostridium*, *Bacillus* e *Streptococcus*), (menor que 55 mol %) (Woese, 1987; Dworkin, 1999-2005).

Essa característica foi recentemente empregada para a avaliação da diversidade de bactérias (Holben & Harris, 1995) em amostras ambientais. Primeiramente, o DNA é extraído de forma indireta, de modo a garantir que apenas o DNA de bactérias esteja presente. Posteriormente, o DNA é centrifugado em um gradiente de cloreto de Césio com bisbenzimidazol, tendo esse último a propriedade de se ligar às bases adenina e timina do DNA. O cloreto de césio gera gradientes densos, os quais são especialmente úteis para a separação de ácidos nucleicos e proteínas (Alberts et al., 1994). Conseqüentemente, há uma alteração na densidade do DNA proporcional à quantidade de bisbenzimidazol a ele ligado. Dessa forma, cria-se um gradiente de moléculas com diferentes frações, cada uma contendo DNA de diferente constituição e, conseqüentemente, de diferentes grupos filogenéticos. A abundância relativa de cada fração pode ser utilizada como uma medida de abundância desses diferentes grupos filogenéticos na comunidade. As diferentes frações podem ser separadas e estudadas com o auxílio de métodos que forneçam informação mais detalhada sobre identidade dos membros da comunidade, tais como clonagem e seqüenciamento.

Outro exemplo da aplicação da técnica é o trabalho de Nusslein & Tiedje (1999) em que esses autores empregaram o fracionamento do DNA em G+C para o estudo de comunidades de bactérias de solo do Havaí, em áreas com floresta e pastagem. Verificou-se que o DNA de comunidades em solo sob pastagem apresentou maior conteúdo de G+C do que o DNA das comunidades de floresta, apresentando, respectivamente, picos em 67% e 61%, com picos adicionais para a comunidade da pastagem (Figura 2.7). Posteriormente, frações

do DNA foram coletadas para clonagem, seqüenciamento e identificação filogenética das bactérias mais abundantes. Esses autores verificaram que os **filotipos** mais abundantes no solo de floresta eram diferentes daqueles abundantes no solo de pastagem e que a fração com 63% G+C dos dois solos era constituída por DNA de espécies diferentes, com mudança de *Fibrobacter* e *Syntrophomonas* predominando na fração de 63% C+C no solo de floresta para *Burkholderia* e *Rhizobium-Agrobacterium* no solo de pastagem.

Uma vantagem dessa metodologia é que a abundância de frações pode ser determinada, de modo que se pode focalizar em grupos mais e menos abundantes da comunidade. Essa é uma forma de lidar com a alta diversidade de bactérias no solo. Se grupos de baixa abundância forem o alvo, essa técnica

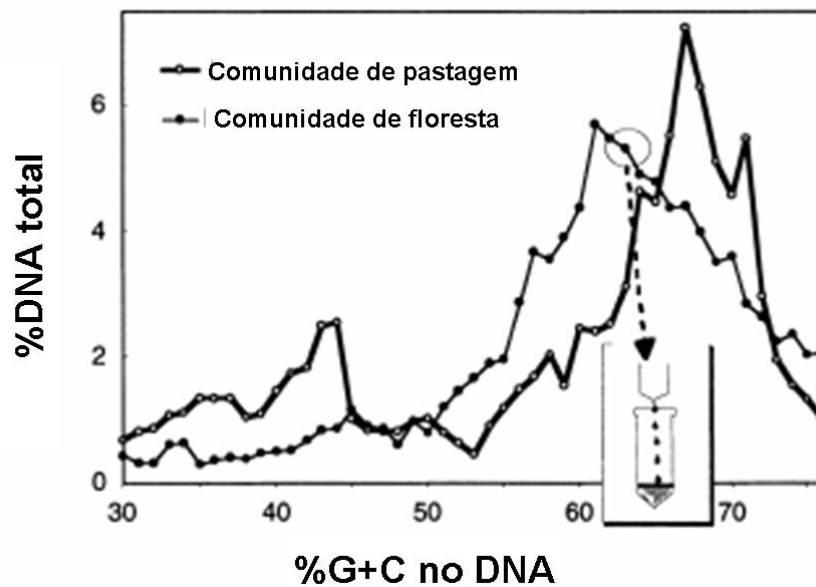


FIGURA 2.7 Perfil mostrando a proporção de DNA obtido de acordo com a %G+C para comunidades de bactérias de solos de floresta e pastagem do Havai (Nusslein & Tiedje, 1999; Tiedje et al., 1999). Reproduzido com permissão de Elsevier.

permite a detecção desses grupos, visto que DNA dessas bactérias pode ser separado e analisado posteriormente. Além disso, essa metodologia não está sujeita aos erros de PCR e perdas de material devido à hibridização ineficiente. São desvantagens a laboriosidade da técnica, a necessidade de grande quantidade de DNA (e.g. 50 µg) e o fato de que apenas uma identificação de categorias taxonômicas superiores pode ser realizada com base no perfil de %G+C. Caso uma maior resolução seja requerida (e.g. gênero espécie), o DNA deve passar por análises posteriores (Tiedje et al., 1999).

#### **TÉCNICAS DE FINGERPRINTING OU PERFIS DE COMUNIDADES**

Podemos definir as técnicas de *fingerprinting* como técnicas que fornecem um perfil ou assinatura característica dos organismos ou comunidades de interesse. O nome *fingerprint* pode ser traduzido literalmente como “impressão digital” e faz alusão à idéia de assinatura característica e específica de um organismo, seja no nível de estirpe, espécie ou categorias taxonômicas superiores. Pode-se também fazer analogia com os códigos de barra utilizados para identificação de um produto, visto que algumas técnicas produzem padrões similares (Figura 2.8). Quando aplicado ao estudo de comunidades bacterianas, o termo *fingerprint* se refere ao perfil ou assinatura característicos das comunidades estudadas. Aqui essas serão chamadas de perfis de organismos, quando aplicadas ao estudo de organismos isolados, ou perfis de comunidades, quando aplicadas ao estudo de comunidades. Elas permitem um acesso rápido à estrutura e composição de comunidades bacterianas, de modo que várias amostras podem ser avaliadas e comparadas rapidamente.



Existem diferentes técnicas para obtenção do perfil de comunidades, com diferentes níveis de resolução, e que podem ser utilizadas por si só ou em conjunto com outras técnicas. Essas permitem detectar, indiretamente, diferenças no tamanho e na composição de seqüências de DNA, de modo que seqüências pertencentes a diferentes organismos podem ser separadas e posteriormente sequenciadas. Características tais como **polimorfismos** no tamanho de fragmentos de restrição, diferentes pontos de **desnaturação** e o dobramento diferenciado da molécula de DNA fita simples podem ser utilizados para a separação de seqüências de espécies diferentes por meio das técnicas de T-RFLP, DGGE/TGGE e SSCP, respectivamente.

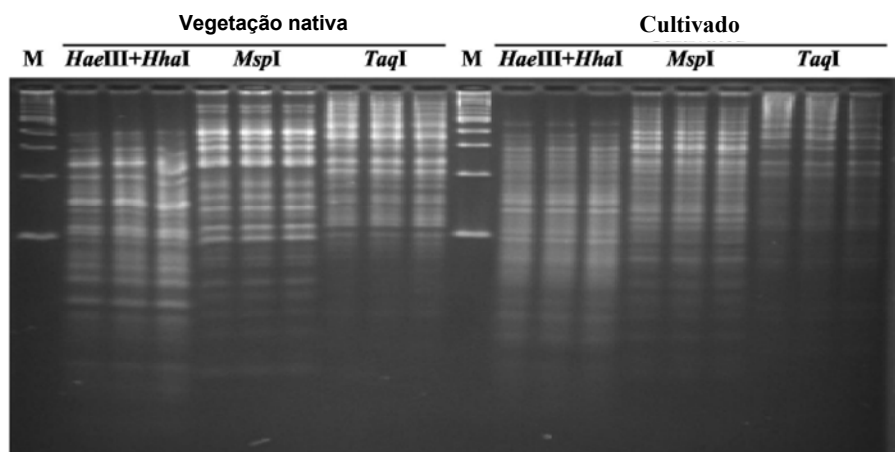


FIGURA 2.8 Análise de fragmentos de restrição polimórficos do gene *nosZ* amplificado por PCR a partir de amostras de solo com vegetação nativa e culturas. As amostras foram analisadas em triplicata e digeridas com as enzimas *MspI*, *TaqI* e *HaeIII+HhaI* (Stres et al., 2004). É possível detectar diferenças entre os perfis das comunidades de bactérias dos solos com vegetação nativa e cultivado. Contudo, o padrão é muito complexo para se fazer inferências sobre a estrutura das comunidades. Repare que os perfis gerados se assemelham aos códigos de barra encontrados nos produtos comerciais. Reproduzido com autorização do autor e da Sociedade Americana de Microbiologia.

### **POLIMORFISMO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO TERMINAIS (T-RFLP)**

A análise do **polimorfismo** de fragmentos de restrição terminais (*terminal restriction fragment length polymorphism* - T-RFLP) é uma técnica que se tem mostrado promissora para o estudo de comunidades bacterianas do solo (Marsh, 1999). A técnica de T-RFLP é derivada da combinação de três outras técnicas: a reação em cadeia da polimerase (PCR), o polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) e a eletroforese de ácidos nucléicos (Liu et al., 1997; Marsh, 1999). Ela assemelha-se a análise de restrição do DNA ribossomal amplificado – ARDRA, na qual o gene 16S rRNA é amplificado e digerido por endonucleases. As endonucleases são enzimas que reconhecem seqüências de nucleotídeos específicas, ligam-se ao DNA nas regiões onde essas seqüências se encontram e cortam a dupla-fita. Por exemplo, as enzimas *EcoRI*, *AluI* e *MspI* reconhecem as seqüências GAATTC, CAGCTG e TCCGGA, respectivamente, e cortam o DNA sempre que uma dessas seqüências é encontrada na dupla-fita (Figura 2.9). Dessa forma, seqüências com composição de bases diferentes são cortadas em pontos diferentes e, conseqüentemente, geram fragmentos de tamanhos diferentes. Os produtos de digestão são então analisados em um gel, gerando um padrão de fragmentos de DNA que pode ser utilizado para a comparação de estirpes e comunidades (Figura 2.10). Contudo, os padrões obtidos para comunidades com a utilização do ARDRA e PCR-RFLP, no caso de outros genes, são muito complexos e não permitem a identificação dos organismos presentes (Tiedje et al., 1999) (Figura 19.8). A diferença na análise de T-RFLP é que os iniciadores utilizados para a PCR são marcados com fluorescência de modo que somente os fragmentos de restrição terminais são detectados, o que reduz a complexidade da análise (Figura 19.10). Os produtos de digestão são analisados em um seqüenciador automatizado, que detecta a fluorescência dos fragmentos terminais. Os resultados podem ser visualizados na forma de gráficos, nos quais cada fragmento terminal de DNA é representado

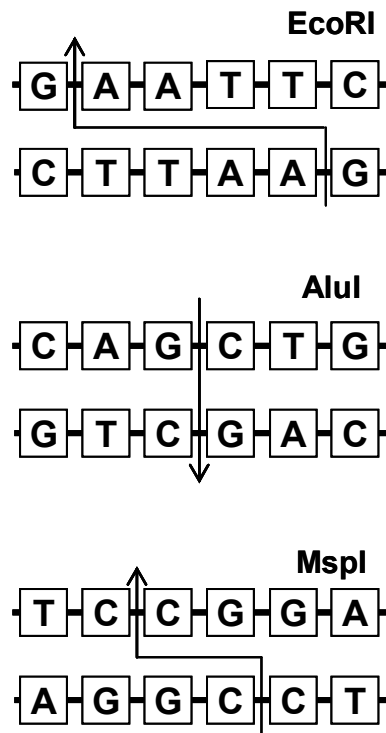


FIGURA 2.9 Esquema mostrando os sítios de reconhecimento e corte para três enzimas de restrição: EcoRI, AluI e MspI. O corte é indicado pelas setas. (modificado de Alberts *et al.* 1994).

por um pico e a sua abundância representada pela área ou altura do pico (Figura 2.11). Outros marcadores além do gene 16S rRNA podem ser utilizados, os quais permitem que grupos funcionais e taxonômicos específicos sejam estudados. Exemplos da aplicação da técnica de T-RFLP com outros genes são os estudos com genes *nirK* e *nirS*, para desnitrificadores (Braker *et al.*, 2001; Avrahami *et al.*, 2002) e *pmoA*, *mmoX* e *mxoF*, para metanogênicos (Horz *et al.*, 2001).

Na análise de T-RFLP fragmentos de tamanho considerável podem ser detectados e, com a utilização dos novos seqüenciadores, é possível detectar

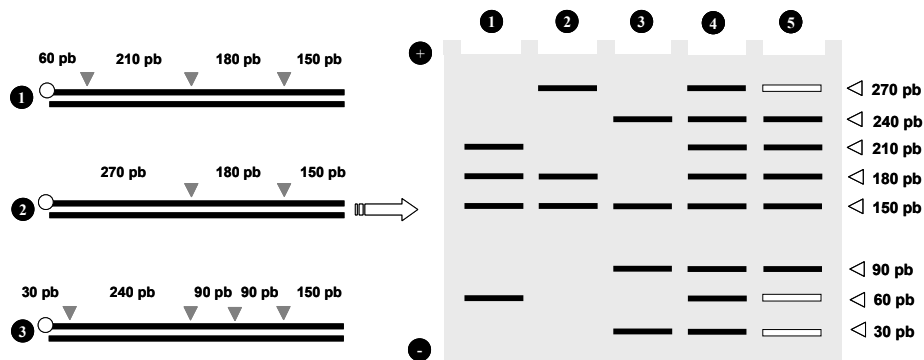


FIGURA 2.10 Esquema mostrando o princípio da técnica de T-RFLP. Três seqüências parciais do gene 16S rRNA de bactérias diferentes são apresentadas à esquerda. As setas cinza indicam os sítios de corte para uma dada endonuclease e círculos brancos representam os iniciadores marcados com fluorescência. À direita é apresentado um gel onde o produto de digestão das três seqüências foi analisado separadamente (perfis de 1 a 3), em conjunto (ARDRA), representando uma comunidade hipotética constituída pelos 3 organismos (perfil 4) e em conjunto após amplificação com iniciadores fluorescentes (R-RFLP), com os fragmentos detectados em branco (perfil 5).

fragmentos de até 800 pares de base (pb)<sup>2</sup>. Em alguns estudos, fragmentos de até 1000 pb puderam ser incluídos na análise após a otimização da eletroforese capilar (Moeseneder et al., 1999). Além disso, no T-RFLP é possível separar fragmentos com apenas 2 pb de base de diferença sob condições de desnaturação em géis de seqüenciamento ou em capilares para fragmentos de até 600 pb (Liu et al. 1997) o que mostra que essa técnica é bastante sensível.

Os perfis de T-RFLP podem ser analisados com o auxílio de programas comerciais, tais como os programas GeneScan, Genotyper, Genemapper e similares (Marsh, 2005). Além dessas, foram desenvolvidas recentemente várias ferramentas, a maioria delas gratuita, que tornam a análise dos dados de T-RFLP mais rápida, fácil e eficiente. Como exemplo podem ser citadas as metodologias e ferramentas desenvolvidas pelo grupo IBEST, da Universidade de Idaho, EUA,

<sup>2</sup> T. L. Marsh, comunicação pessoal

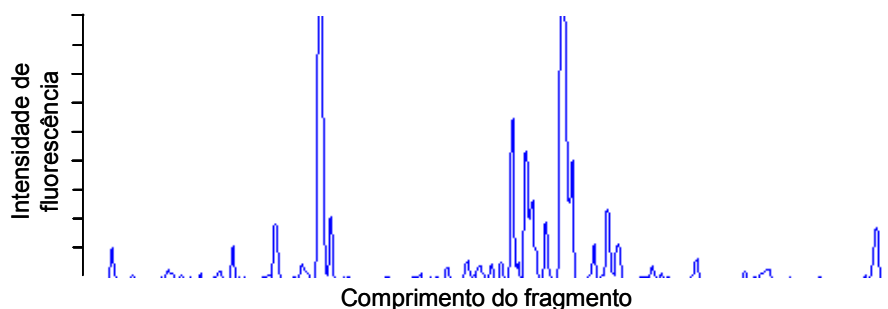


FIGURA 2.11 Perfil de T-RFLP para comunidade de bactérias de solo da floresta amazônica (Jesus, dados não-publicados). Cada pico é um fragmento terminal de DNA de tamanho diferente. Picos com maior altura, expressa em unidades de fluorescência, referem-se a fragmentos de DNA presentes em maior quantidade.

onde se utilizam vários programas (perl, R e SAS) para diferenciar entre picos verdadeiros do ruído de fundo, padronização e alinhamento dos perfis, agrupamento e seleção de amostras para seqüenciamento (Abdo et al., 2006); o programa T-Align, que realiza a seleção de picos baseado em duplicatas, alinhamento, padronização dos perfis e geração de matrizes para análises multivariadas (Smith et al., 2005); os programas TAP e TRFMA e o pacote TRAMPR, criado para o programa R, os quais permitem realizar a digestão in silico de bases de dados para 16S rRNA para análise filogenética de perfis de T-RFLP (Marsh et al., 2000; Nakano et al., 2006). Também existe um programa gratuito, o *GeneScan View*<sup>3</sup> que permite a visualização dos perfis um a um e gera uma tabela com dados de altura e área dos picos, dentre outros. Apesar de ser incipiente, esse programa gera *outputs* suficientes para se utilizarem outros programas para a análise posterior dos dados como o T-Align e as ferramentas do IBEST.

<sup>3</sup> Página da internet: <http://www.bmr-genomics.it/>

A princípio, a detecção dos fragmentos terminais permite que inferências filogenéticas sejam feitas porque cada fragmento representa um **ribotipo** ou **unidade taxonômica operacional (UTO)**, o qual pode ser relacionado a grupos filogenéticos específicos de bactérias (Tiedje et al., 1999). Existem algumas bases de dados disponíveis para esse fim (Marsh et al., 2000; Kent et al., 2003). Contudo, essa prática tem sido vista com cautela, pois um pico pode representar mais de um organismo diferente, e porque não se pode identificar uma espécie com base em apenas um ou dois sítios de restrição (Marsh, 2005). Em função disso, a abordagem mais recente tem sido utilizar o T-RFLP para um exame rápido da estrutura das comunidades e para a seleção de amostras visando à construção de bibliotecas genômicas. As seqüências da biblioteca podem ser cortadas *in silico* (por meio de simulação em computador) e os fragmentos terminais comparados com aqueles encontrados por T-RFLP, para relacionar os picos a grupos filogenéticos específicos. Essa é uma abordagem mais segura do que a comparação com bases de dados on-line, pois restringe a identificação dos picos a espécies presentes na comunidade estudada. Recentemente, foram desenvolvidas metodologias procurando eliminar essa desvantagem. Em uma delas, fragmentos terminais específicos podem ser isolados, reamplificados e clonados (Widmer et al., 2006). Na outra, os fragmentos terminais de seqüências amplificadas com um iniciador biotilado são fisicamente capturados em pérolas. Os fragmentos são analisados em gel de agarose e podem ser retirados do gel para seqüenciamento (Blackwood & Buyer, 2007).

Como exemplo da aplicação do T-RFLP para o estudo de comunidades bacterianas, pode-se citar o trabalho de Blackwood & Paul (2003), em que esses autores identificaram comunidades bacterianas diferentes na rizosfera e nas frações leve e pesada do solo, as quais estão associadas a diferentes formas de matéria orgânica, bem como nos três sistemas agrícolas estudados (EUA). A maior variabilidade foi encontrada na rizosfera e nos resíduos da parte aérea de

plantas. O T-RFLP também foi empregado por Noguez et al. (2005) para estudar a biogeografia de comunidades de bactérias do solo em um dos sítios localizados em uma floresta tropical decídua do México. Eles verificaram que essas apresentaram-se bem estruturadas, sugerindo biogeografia semelhante à encontrada em comunidades de vertebrados. Várias UTOs apresentaram distribuição extremamente restrita e grande porcentagem dessas foram encontradas em apenas uma ou duas localidades.

Apenas um estudo empregando T-RFLP foi encontrado no Brasil (Brito et al., 2006). Nesse estudo, comunidades de bactérias de sedimentos de manguezal foram avaliadas em mesocosmos contaminados com petróleo e em consórcios de bactérias em culturas de enriquecimento com hidrocarbonetos. Os resultados revelaram que o enriquecimento reduziu drasticamente o número de fragmentos encontrados nos perfis de T-RFLP e esse resultado foi atribuído à pressão seletiva existente nesse tipo de cultivo.

#### **ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DE DESNATURAÇÃO (DGGE) E ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DE TEMPERATURA (TGGE)**

As técnicas de DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) e TGGE (*temperature gradient gel electrophoresis*) são bastante similares, com a diferença de que, na primeira, utiliza-se um gradiente químico de desnaturação e, na segunda, um gradiente de temperatura para a separação de moléculas de DNA (Etscheid & Riesner, 1998). Essas técnicas se baseiam no princípio de que moléculas de DNA fita-dupla parcialmente desnaturadas apresentam mobilidade significativamente reduzida em gel de **eletroforese** com gradiente de desnaturação em comparação com moléculas não-desnaturadas. A desnaturação da molécula de DNA ocorre em regiões com pontos de desnaturação similares, conhecidas como domínios de desnaturação, que ocasionam uma mudança conformacional, reduzindo assim a mobilidade da molécula no gel (Figura 2.12).

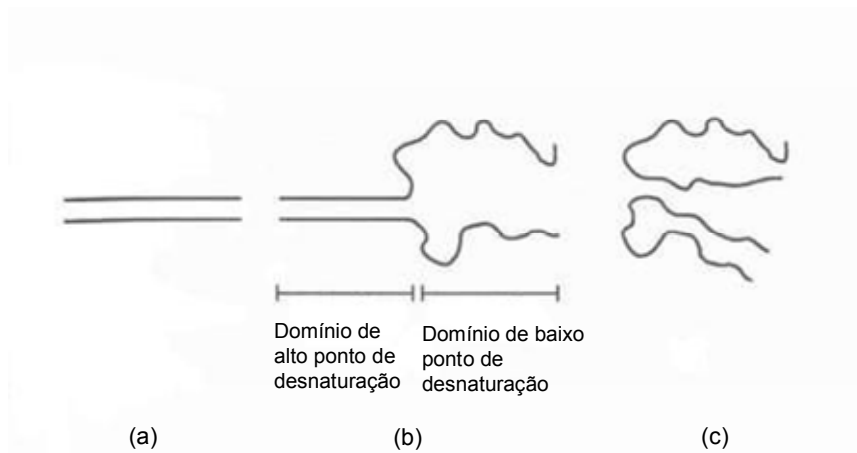


FIGURA 2.12 Esquema mostrando a molécula fita dupla de DNA em sua conformação normal (a), parcialmente (b) e totalmente desnaturada (c). Na molécula parcialmente desnaturada (b) o domínio de alto ponto de desnaturação contém maior teor de guanina e citosina comparado ao domínio de baixo ponto de desnaturação, o que lhe confere maior resistência à desnaturação.

Desse modo, moléculas de DNA com o mesmo tamanho, mas com seqüências diferentes, podem ser separadas, visto que as diferenças na seqüência implicam diferentes pontos de desnaturação. Esse princípio foi primeiramente utilizado para detecção de mutações pontuais em moléculas de DNA e, posteriormente, aplicado ao estudo de diversidade de microrganismos (Muyzer et al., 1993).

O gene de interesse é amplificado com um iniciador contendo um grampo de guanina e citosina com o objetivo de evitar a separação total da fita dupla de DNA durante a eletroforese. A utilização do grampo aumenta a detecção de variantes de 50% para quase 100% em seqüências de 500 pb (Myers et al., 1985). Posteriormente, o produto de PCR é submetido à eletroforese em um gel de poliacrilamida com gradiente de desnaturação. No caso da DGGE, o gradiente de desnaturação é criado com um gradiente crescente de uréia e



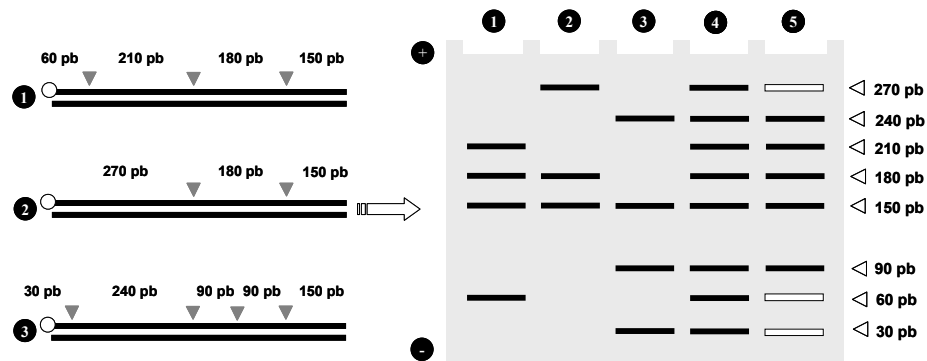


FIGURA 2.13 Esquema mostrando o princípio da técnica de DGGE/TGGE. À esquerda são apresentadas três seqüências de 16S rRNA com o mesmo tamanho, porém com composição de bases diferente. À direita é apresentado um gel com gradiente de desnaturação (químico ou de temperatura) onde as três seqüências foram analisadas. Os poços 2 a 4 apresentam as três seqüências analisadas em separado. O poço 5 apresenta as três seqüências analisadas em conjunto. Essas são desnaturadas em condições diferentes e, por isso, pararam em posições diferentes no gel. Os poços 1 e 6 representam os padrões de referência.

formamida e, no caso da TGGE, por um aumento linear da temperatura. Após a eletroforese, o gel é corado e o padrão de bandas no perfil pode ser utilizado para se comparar diferentes comunidades (Figura 2.13). Tanto a presença e ausência como a intensidade das bandas podem ser utilizadas na comparação. Bandas de interesse podem ser excisadas e posteriormente seqüenciadas para a identificação do microorganismo. A identificação também pode ser alcançada por meio da hibridização das bandas com sondas específicas (Muyzer & Smalla, 1998).

A DGGE é a técnica mais utilizada para a análise de comunidades bacterianas, embora a utilização de outras técnicas, especialmente do T-RFLP, tenha crescido consideravelmente. De acordo com levantamento realizado na

base de dados Scopus<sup>4</sup> foram publicados, até 2006, 1.543 trabalhos com DGGE e bactérias em revistas indexadas, sendo 973 deles estudando bactérias em solos; para o T-RFLP em bactérias, 382 artigos foram publicados, sendo 296 deles estudando bactérias em solos. Alguns trabalhos mostram que o T-RFLP é mais sensível que o DGGE, detectando maior número de UTOs (Moeseneder et al., 1999). Porém, autores relacionados ao DGGE (Smalla et al., 2007), já encontraram menor complexidade nos padrões de T-RFLP do que nos padrões de DGGE e indicaram que essas técnicas e o SSCP produzem resultados similares. Portanto, a escolha de qual delas utilizar depende dos objetivos do estudo e do *expertise* dos pesquisadores envolvidos. A vantagem do T-RFLP em relação ao DGGE é que os grupos presentes nas comunidades podem ser identificados, embora com restrições conforme anteriormente apresentado, enquanto o DGGE fornece um perfil com número de bandas muito inferior ao número potencial de espécies presentes na amostra e certamente representantes de grupos, mas que não podem ser identificáveis através da técnica. Já, a vantagem da DGGE comparado ao T-RFLP é que as bandas podem ser retiradas do gel e posteriormente seqüenciadas para a identificação do microrganismo. Contudo, recentemente foram desenvolvidas metodologias em que os fragmentos terminais no T-RFLP podem ser isolados, reamplificados e clonados, permitindo uma identificação mais acurada das populações de bactérias em questão (Widmer et al. 2006; Blackwood & Buyer, 2007). Atualmente está sendo desenvolvida a automação da DGGE em capilares, o que propiciará a análise simultânea de um grande número de amostras e a utilização de um padrão de peso molecular interno, o que tornará a comparação de perfis mais precisa (van Elsas et al., 2006).

Como exemplo da aplicação da DGGE para o estudo de bactérias do solo, pode-se citar o trabalho de Nogueira et al. (2006). Esses autores

---

<sup>4</sup> Página da internet: [www.scopus.com](http://www.scopus.com)

observaram que o padrão de agrupamento de áreas sob diferentes sistemas de uso da terra no Paraná com base na DGGE foi similar àquele obtido com base na avaliação de 24 atributos químicos, físicos e biológicos do solo relacionados aos ciclos do C e do N, demonstrando a aplicabilidade dos perfis de comunidades, em especial da DGGE, para avaliação dos efeitos de cultivo. Esses resultados mostraram que a utilização diferenciada da terra levou a mudanças na estrutura das comunidades bacterianas e que essas mudanças estão ligadas a mudanças em atributos do solo. Semelhantemente, Peixoto et al. (2006) observaram que comunidades de solo sob cultivo convencional diferiram de comunidades de solo sob plantio direto, tanto por DGGE com o gene 16S rRNA como com o gene *rpoB*, sendo que o *rpoB* permitiu uma melhor visualização das diferenças entre amostras.

#### **POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE FITA SIMPLES (SSCP)**

A mobilidade eletroforética de um fragmento de DNA é função não só de seu tamanho, mas também de sua conformação. Fitas simples de DNA podem se dobrar e assumir conformação específica de acordo com a estrutura interna e a seqüência de nucleotídeos da molécula. Essas mudanças conformacionais resultam em mudanças na mobilidade do DNA fita simples em gel de poliacrilamida permitindo, assim, a separação das moléculas. Até mesmo moléculas de DNA diferindo em apenas uma base podem ser separadas (Orita et al. 1989). Essa propriedade, chamada de polimorfismo conformacional de seqüências de DNA fita simples (em inglês *single strand conformational polymorphism* ou SSCP), foi utilizada para detecção de polimorfismos de seqüência em DNA genômico de humanos (Orita et al. 1989) e, posteriormente, foi aplicada para o estudo de comunidades de microrganismos em amostras ambientais (Lee et al. 1996).

O método de SSCP consiste na amplificação da seqüência-alvo, transformação do DNA fita dupla em DNA fita simples por desnaturação e

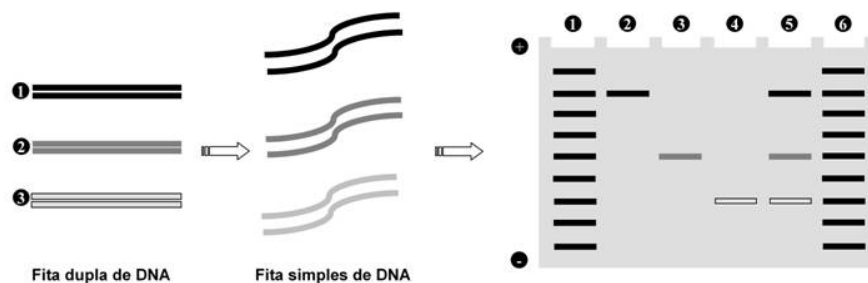


FIGURA 2.14 Esquema mostrando o princípio da técnica de SSCP. Três seqüências do gene 16S rRNA de bactérias diferentes são apresentadas à esquerda. Essas seqüências são transformadas em fita simples, as quais adquirem diferentes conformações. Em função dessas diferenças de conformação as seqüências apresentam mobilidades diferentes no gel de eletroforese. Os poços 2 a 4 mostram as três seqüências analisadas em separado e o poço 5 representa as três seqüências analisadas em conjunto. Os poços 1 e 6 representam os padrões de referência.

análise em gel de poliacrilamida (Figura 2.14). Inicialmente, os fragmentos de DNA obtidos eram muito pequenos, abrangendo apenas a região V-3 do gene 16S rRNA (Lee et al. 1996) mas, posteriormente, foram desenvolvidos iniciadores capazes de amplificar fragmentos maiores, com tamanho comparável àqueles utilizados na DGGE (aproximadamente 408 pares de bases) incluindo as regiões V-4 e V-5 (Schwieger & Tebbe, 1998). Como na DGGE, bandas de interesse podem ser excisadas, sequenciadas e utilizadas para a identificação dos membros da comunidade. Várias etapas são críticas para obtenção de resultados confiáveis: a escolha da região do gene a ser amplificada, o procedimento de desnaturação, a concentração, comprimento e temperatura do gel, a utilização de aditivos (e.g. glicerol e formamida), o procedimento de coloração etc. Consultar Lee et al. (1996) e Orita et al. (1989) para maiores detalhes.

Schwieger & Tebbe (2000) utilizaram o SSCP para o monitoramento de uma estirpe de *Sinorhizobium meliloti* em rizosferas de plantas na Alemanha. A

utilização do SSCP em conjunto com técnicas de cultivo permitiu detectar comunidades específicas de bactérias relacionadas a diferentes espécies de plantas, bem como o efeito da inoculação sobre essas comunidades. Backman et al. (2003) verificaram efeitos da calagem sobre comunidades de bactérias oxidadoras de amônio (BOA) em um solo de floresta da Suécia pelo emprego de SSCP e DGGE. Uma alta diversidade genética de bactérias relacionadas ao gênero *Nitrosospira* foi encontrada no solo com calagem, enquanto nenhuma seqüência de BOA foi encontrada no solo sem calagem. Além de aumentar a diversidade genética, maiores doses de calagem levaram a um maior aumento da diversidade genética em profundidade.

Recentemente, foi descrita uma adaptação da técnica para utilização de eletroforese capilar (King et al., 2005). Os fragmentos de DNA são amplificados com iniciadores marcados com fluorescência, de modo que esses podem ser detectados a laser nos capilares. Resultados preliminares de testes com culturas puras foram bem sucedidos, porém ainda são necessários estudos com DNA extraído de amostras ambientais. Outra adaptação recente utilizou a separação de seqüências de rRNA provenientes de comunidades bacterianas por SSCP em uma etapa anterior ao seqüenciamento (MacGregor & Amman, 2006). Nesse caso, a PCR não é utilizada, o que evita erros inerentes a essa técnica. O RNA total da comunidade pode ser analisado diretamente em gel de poliacrilamida. Posteriormente, as bandas de interesse podem ser excisadas do gel, amplificadas em reação com a enzima transcriptase reversa e seqüenciadas.

#### **ANÁLISE DO ESPAÇADOR INTERGÊNICO DO RNA RIBOSSOMAL (RISA) E ANÁLISE AUTOMATIZADA DO ESPAÇADOR INTERGÊNICO DO RNA RIBOSSOMAL (ARISA)**

Os genes que codificam para os RNA ribossomais de bactérias estão organizados em unidades conhecidas como operons, cujo número pode variar

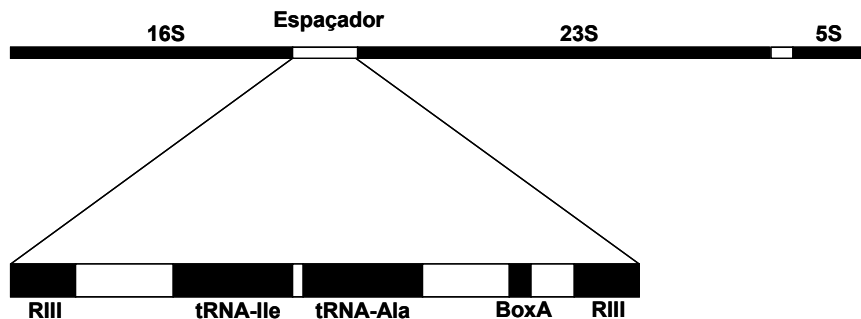


FIGURA 2.15 Esquema mostrando o espaçador intergênico de bactérias (García-Martínez et al., 1999).

entre 1 e 11 operons por genoma, de acordo com a espécie de bactéria em questão. Na maioria dos casos, esses genes estão organizados no sentido 16S-23S-5S, sendo que entre eles existem regiões conhecidas como espaçadores intergênicos, nas quais estão presentes unidades funcionais, tais como tRNAs e regiões envolvidas no reconhecimento de enzimas (Figura 2.15). Essas regiões possuem comprimento e seqüências variáveis entre espécies devido ao número variável de unidades funcionais presentes (Loughney et al., 1982; Chun et al., 1999; García-Martínez et al., 1999). Desse modo, ela pode ser utilizada para diferenciação entre isolados de bactérias.

A primeira técnica desenvolvida para o estudo de comunidades bacterianas e que utiliza o espaçador intergênico como seqüência-alvo é conhecida como análise do espaçador intergênico do RNA ribossômico (em inglês *rRNA intergenic spacer analysis*, ou RISA). Nessa técnica, o espaçador intergênico dos membros da comunidade é amplificado por PCR e os fragmentos obtidos são avaliados por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (Borneman & Triplett, 1997; García-Martínez et al., 1999). Devido à diversidade de tamanhos encontrada para o espaçador intergênico, os fragmentos podem ser separados em gel de agarose em aparelhos convencionais

de eletroforese, o que é uma vantagem quando comparado a DGGE. Após a separação dos fragmentos no gel, um padrão de bandas, as quais pertencem a diferentes organismos da comunidade, é gerado. Essas bandas podem ser excisadas do gel e seqüenciadas para posterior identificação. As seqüências obtidas podem ser comparadas com outras seqüências depositadas em bases de dados específicas para o espaçador intergênico (García-Martínez et al., 2001).

Posteriormente a técnica foi automatizada, passando a chamar-se Análise Automatizada do Espaçador Intergênico do RNA Ribossomal (em inglês *automated rRNA intergenic spacer analysis*, ou ARISA). O princípio é similar ao utilizado na análise de T-RFLP. O espaçador intergênico ribossomal do DNA total do solo é amplificado com um iniciador marcado com fluorescência, o qual permite a detecção desses fragmentos em um seqüenciador (Fisher & Triplett, 1999). Uma vantagem em relação ao T-RFLP é que não é necessário cortar os produtos de amplificação com enzimas de restrição e esses são avaliados diretamente no seqüenciador. Como a região intergênica é altamente variável em comprimento e em seqüência, o polimorfismo natural é utilizado para definição de UTOs. Os perfis gerados são similares aos obtidos por T-RFLP, com picos representando seqüências de diferentes tamanhos e as suas abundâncias.

Vários estudos demonstraram a aplicação da técnica para estudos de diversidade de comunidades bacterianas em diferentes ambientes (Borneman & Triplett, 1997; Ranjard et al., 2001; Gros et al., 2003; Newton et al., 2006; Ranjard et al., 2006). De acordo com alguns autores, essa técnica foi sensível, podendo detectar alterações na estrutura das comunidades. Pode-se citar como exemplo o trabalho de Borneman & Triplett (1997), o qual foi o primeiro trabalho publicado com técnicas independentes do cultivo para estudo de comunidades de bactérias do solo da Amazônia. Esses autores utilizaram-se do RISA para avaliar o efeito da conversão da floresta para pastagem sobre a estrutura de comunidades de bactérias. Foi possível verificar que várias bandas

foram únicas de cada sistema estudado, o que foi corroborado pelo resultado encontrado com a construção de bibliotecas genômicas com o gene 16S rRNA. Em outro estudo de comunidades de solo, Lejon et al. (2005) identificaram, por meio de ARISA, a alteração na composição de comunidades de solos sob diferentes espécies de árvores, demonstrando o efeito da vegetação sobre essas comunidades. Também, essa técnica foi utilizada por Fuhrman et al. (2006) para demonstrar a existência de padrões temporais repetitivos de distribuição e abundância de organismos de comunidades de plâncton marinho, durante um período de 4,5 anos. Embora não seja aplicado a solo, esse trabalho é um bom exemplo do potencial de aplicação de técnicas que revelam o perfil das comunidades, em especial da ARISA. O resultado encontrado por esses autores sugere que a distribuição e abundância dos táxons de bactérias por eles encontrados possa modular funções no ecossistema e que um subgrupo significativo de bactérias exibiu baixos níveis de redundância funcional, o que já é documentado para comunidades animais e vegetais.

#### **BIBLIOTECAS GENÔMICAS**

As bibliotecas genômicas consistem em coleções de seqüências de DNA. Essas bibliotecas podem ser construídas considerando-se DNA ou RNA de qualquer organismo, bem como baseando-se em seqüências obtidas de amostras ambientais (Tringe & Rubin, 2005). A abordagem mais utilizada para o estudo de comunidades e populações de bactérias no ambiente é a amplificação, clonagem e seqüenciamento de genes presentes nos organismos da comunidade, os quais são utilizados para a sua identificação. O gene-alvo mais utilizado é o 16S rRNA, que fornece visão geral da composição da comunidade, visto estar presente em todas as bactérias. Contudo, outros genes podem ser utilizados para o estudo de populações específicas, por exemplo, o gene *amoA*, para o estudo de



bactérias nitrificadoras, e os genes *nir*, para o estudo de denitrificadores (Horz et al., 2000; Wolsin & Priemé, 2004).

Resumidamente, o DNA/RNA dos organismos da comunidade é extraído, as seqüências de interesse são amplificadas por PCR ou transcriptase reversa de retrovírus (no caso de utilização de RNA em vez do DNA) e posteriormente clonadas em vetores, em geral plasmídeos. Esses plasmídeos são então inseridos em células competentes de *Escherichia coli*, onde são multiplicados (Figura 2.16). O seqüenciamento realizado nas diferentes cópias do gene obtidas por PCR e sua comparação com bases de dados fornecem informação sobre a diversidade filogenética das bactérias presentes no material estudado. Essas seqüências podem ser utilizadas para construção de árvores filogenéticas, de modo a revelar relações evolutivas entre os organismos da comunidade, para comparação com bases de dados tais como o *GenBank*<sup>5</sup> (Benson et al., 2005) e o *Ribosomal Data Base Project*<sup>6</sup> (Cole et al., 2007), e para o cálculo de índices de diversidade, estimadores de riqueza de espécies, dentre outras metodologias de análise de dados ecológicos. Atualmente, existem vários *softwares* elaborados para a análise de bibliotecas genômicas, e.g. o DOTUR, o SLibshuff, o FastGroupII, o TreeClimber, o SONS e o Unifrac (Singleton et al. 2001; Schloss et al. 2004; Schloss & Handelsman, 2005; Schloss & Handelsman, 2006a; Schloss & Handelsman, 2006b; Lozupone et al., 2006), os quais aplicam abordagens diversas para fazer o cálculo de índices de diversidade e para comparação das bibliotecas.

Em ambientes muito ricos em espécies de bactérias, como, em geral, é o caso do solo (Kemp & Aller, 2004; Gans et al., 2005; Tringe et al., 2005), um grande número de seqüências pode ser necessário para que uma boa estimativa da diversidade seja realizada, o que torna a análise muito onerosa. Por exemplo,

---

<sup>5</sup> Página da internet: [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

<sup>6</sup> <http://rdp.cme.mser.edu/>

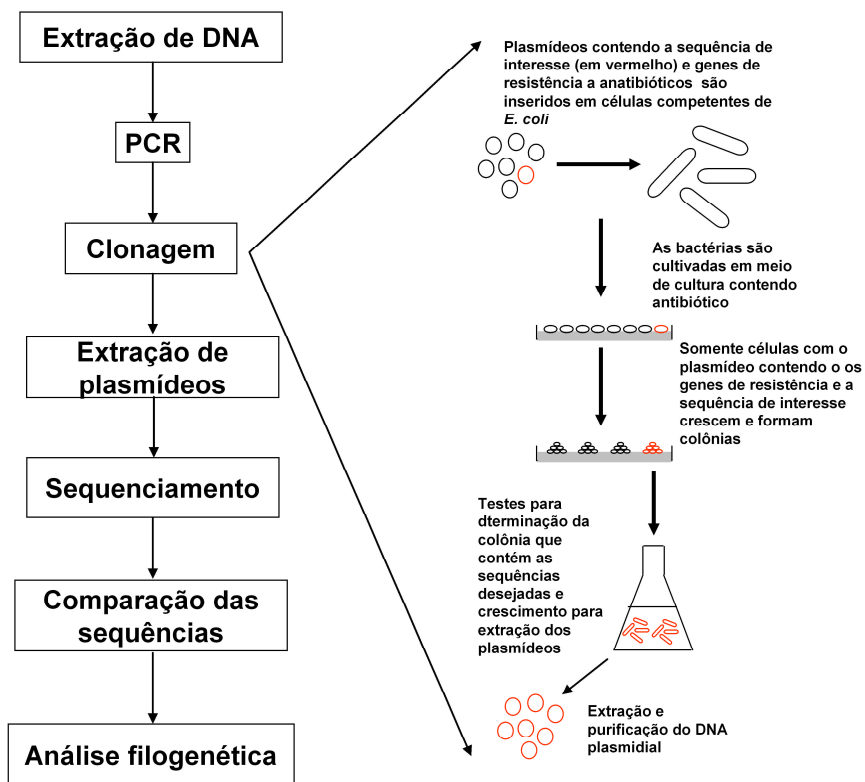


FIGURA 2.16 Fluxograma mostrando as principais etapas da construção e análise de bibliotecas genômicas. O gene de interesse é amplificado por PCR a partir do DNA da comunidade, clonado em vetores e inserido em células de *Escherichia coli* para construção da biblioteca de genes. Os plasmídeos são extraídos dos clones de *E. coli* e enviados para seqüenciamento do inserto. As seqüências podem ser analisadas com o auxílio de diferentes ferramentas de análise de dados e utilizadas para análise filogenética dos membros da comunidade (Adaptado de Alberts et al., 1994).

847 grupos taxonômicos distintos foram identificados dentre 1700 clones de 16S rRNA obtidos de um solo agrícola em Minnesota, EUA e, mesmo com esse grande número de seqüências, a diversidade de espécies foi subestimada, de acordo com resultados de análises estatísticas realizadas com os dados (Tringe et

al., 2005). Estimadores de cobertura para a riqueza de espécies estimaram o número de **ribotipos** presentes nessa comunidade como sendo maior que três mil. O mesmo ocorreu com comunidades de solos de floresta e pastagem da Amazônia (Borneman & Triplett, 1997). Por isso, a abordagem recente tem sido utilizar técnicas mais rápidas e menos onerosas, e.g. DGGE e T-RFLP, para se obter uma visão geral da comunidade e selecionar amostras representativas para clonagem. Contudo, a redução crescente do custo do seqüenciamento *high-throughput* tem tornado a construção de bibliotecas genômicas mais acessível.

O desenvolvimento de tecnologias como o pirosequenciamento têm contribuído para análise de um grande número de sequências em um período de tempo relativamente curto (Margulies et al., 2005). Esta tecnologia permite o sequenciamento de 25 milhões de bases em uma única operação de 4 horas do sequenciador, de modo que um genoma pequeno como o da bactéria *Mycoplasma genitalium* pode ser sequenciado em questão de horas (Margulies et al., 2005). Explicando resumidamente o pirosequenciamento, adaptadores são adicionados às sequências de interesse, as quais são posteriormente ligadas a micropérolas. As sequências são, então, amplificadas dentro de gotas formadas em uma emulsão e contendo todos os reagentes necessários para a reação, de modo a gerar a concentração de DNA necessária para o sequenciamento. Posteriormente, os produtos de amplificação são sequenciados em um slide contendo 1,6 milhão de micro-poços. Assim, milhões de bases podem ser sequenciadas em uma única operação do sequenciador. O pirosequenciador detecta a emissão de fótons quando da liberação do pirofostato durante a reação de incorporação de um nucleotídeo pela DNA polimerase. Embora um grande número de sequências seja obtido, estas tem um comprimento muito curto, contendo entre 100-200 pb. Procurando contornar essa desvantagem, regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA foram amplificadas em estudo recente abordando a diversidade de bactérias e archeas e empregando essa técnica de

sequenciamento (Roesch et al., 2007). Além do grande número de sequências gerado, uma vantagem do pirosequenciamento é que este prescinde do uso de clonagem, o que simplifica a obtenção das sequências, tornando o processo muito mais rápido (Margulies et al., 2005).

### **METAGENÔMICA**

Uma abordagem recente para o estudo de comunidades microbianas é a metagenômica, também conhecida como genômica ambiental, e que é definida como o estudo de seqüências ambientais. Diferencia-se de outras técnicas, tais como os perfis de comunidades, porque focaliza em todos os genes da comunidade – o metagenoma – ao invés de focalizar em apenas um gene (Madigan & Martinko, 2006). Por meio dessa abordagem é possível detectar genes que codifiquem para proteínas já conhecidas e até mesmo reconstruir genomas sem a etapa de cultivo dos organismos. Além disso, ela permite a obtenção de informação mais robusta sobre a identidade genética da comunidade. Dentre as técnicas de estudos do metagenoma, uma das mais utilizadas é o sequenciamento *shotgun* (Tringe & Rubin, 2005). Nessa técnica o DNA dos membros da comunidade é extraído, fragmentado por nebulização ou com enzimas de restrição e inserido diretamente em vetores, sem amplificação. Posteriormente, os clones são seqüenciados aleatoriamente para detecção do que está presente. Dessa forma, fragmentos com genes que codificam uma diversidade de enzimas de diferentes organismos e com diferentes funções são obtidos. Dados de seqüência provenientes dessas bibliotecas contêm uma riqueza de informação sobre a dinâmica da comunidade, tais como interações entre espécies e processos seletivos (Tringe & Rubin, 2005). Essa abordagem permite a detecção de genes importantes para o metabolismo da comunidade e, conseqüentemente, pode revelar aspectos importantes sobre a dinâmica da mesma. Em alguns casos, é possível reconstruir genomas de membros da

comunidade e, mesmo que isso não seja possível, esse é um meio de se distinguir comunidades com base em suas funções (Tyson et al., 2004; Tringe et al., 2005).

Exemplos de estudos em metagenômica são os trabalhos de Tyson et al. (2004), Venter et al. (2004) e Tringe et al. (2005). Tyson et al. (2004) conseguiram seqüenciar genomas quase que completos de bactérias de um biofilme de área de mineração, incluindo o genoma de um membro do filo *Nitrospira*, o qual nunca teve um membro com o genoma seqüenciado anteriormente. Foi possível detectar vários genes relacionados com processos bioquímicos importantes, bem como fazer inferências sobre vias metabólicas existentes nos organismos com o genoma seqüenciado. Contudo, o biofilme estudado por esses autores é um ambiente muito simples se comparado ao solo. Em ambientes complexos como o solo, a aplicação dessa técnica ainda é muito dificultada, pois apenas fragmentos de genomas são recuperados. Estima-se que bilhões de bases teriam que ser seqüenciadas para que genomas completos pudessem ser obtidos. De fato, no estudo de um solo agrícola, com 100 milhões de pares de base seqüenciados, menos de 1% das leituras geradas exibiram sobreposição com leituras de clones independentes, e a reconstrução de genomas foi mal-sucedida. Contudo, famílias de genes importantes para processos bioquímicos puderam ser identificadas (Tringe et al., 2005).

#### **PCR QUANTITATIVA**

A técnica de PCR quantitativa ou PCR em tempo real permite a quantificação de seqüências específicas de ácidos nucléicos em amostras ambientais. A quantidade do produto de amplificação é monitorada durante os ciclos da PCR com a utilização de reagentes fluorescentes que se ligam ao produto de amplificação, sem danificá-lo, ao final de cada ciclo. Alguns são incorporados a sondas e outros se ligam ao DNA de forma inespecífica. A

intensidade de fluorescência está diretamente relacionada à quantidade do reagente ligado à dupla fita de DNA, de modo que essa aumenta com o decorrer da reação em cadeia da polimerase. Desse modo, a quantidade de DNA em cada ciclo pode ser calculada com base na intensidade de fluorescência (Zhang & Fang, 2006). A técnica apresenta uma alta sensibilidade, tendo sido relatada a detecção de uma cópia do genoma por microlitro de solução de DNA extraído do solo (Lerat et al., 2005).

Dois tipos de reagentes fluorescentes podem ser utilizados: corantes que se ligam ao DNA dupla fita e sondas específicas. As sondas se ligam ao DNA durante a etapa de anelamento dos iniciadores. Durante a amplificação a sonda é clivada e o corante é liberado, emitindo fluorescência. As vantagens da utilização de sondas são que somente produtos de amplificação específicos são detectados; sondas com corantes diferentes podem ser utilizadas, de modo que a amplificação de duas seqüências distintas pode ser realizada no mesmo tubo; e os produtos de amplificação não necessitam ser adicionalmente processados após a PCR. A desvantagem é que sondas diferentes são necessárias para seqüências diferentes. Essa desvantagem não existe no caso do uso de corantes, tais como o SYBR *green*, que se ligam à dupla-fita de DNA. Esses corantes se intercalam na dupla-fita DNA durante cada ciclo de amplificação e a fluorescência emitida é detectada. Há um considerável aumento da fluorescência quando o corante se liga à dupla-fita de DNA. Contudo, produtos de amplificação inespecíficos são detectados e seqüências diferentes não podem ser diferenciadas (Bustin & Nolan, 2004; Zhang & Fang, 2006).

Um exemplo da potencialidade da técnica para estudos de ecologia de bactérias é o trabalho de Rodrigues et al. (2002), em que esses autores empregaram a PCR quantitativa para detectar e quantificar uma estirpe de *Rhodococcus* degradadora de PCB em experimentos realizados em microcosmos contendo solo. Sondas específicas foram desenvolvidas para a estirpe e

permitiram a sua detecção. Os resultados encontrados mostraram que as sondas foram específicas para a estirpe-alvo. Foi possível monitorar a variação na abundância da estirpe ao longo do experimento e as estimativas do número de células por grama de solo seco obtidas pela PCR quantitativa foram semelhantes às obtidas pelo cultivo de células. Essa técnica foi utilizada com sucesso para a quantificação de vários grupos de bactérias e genes diferentes em amostras ambientais, tais como oxidantes do amônio (16S rRNA, Hermansson & Lindgren, 2001; *amoA*, Wallenstein & Vilgalys, 2005), desnitrificadores (*nirK*, Henry et al., 2004; Wallenstein & Vilgalys, 2005; *narG*, López-Gutiérrez, 2004; *nosZ*, Wallenstein & Vilgalys, 2005), metanotróficos (Seghers et al., 2003) e fixadores de N<sub>2</sub> (Wallenstein & Vilgalys, 2005). O desenvolvimento de metodologias com genes funcionais é uma alternativa para se obter informações detalhadas sobre a diversidade funcional da comunidade.

Uma preocupação com a aplicação da PCR quantitativa para o estudo de comunidades com o gene 16S rRNA como marcador é que algumas espécies de bactéria podem ter duas ou mais cópias do gene por célula (Klappenbach et al. 2000), de modo que sobrestimativas da abundância dessas espécies podem ser realizadas. De modo a contornar esse problema, Rodrigues & Tiedje (2007) empregaram a PCR em tempo real com outros genes que não o gene 16S rRNA para detectar e quantificar populações de *Exiguobacterium* em solos e sedimentos da Sibéria, Porto Rico e Estados Unidos. Os genes utilizados foram o *rpoB* e o *gyrB*, que estão presentes em uma e duas cópias no genoma de *Exiguobacterium*, respectivamente, e um gene hipotético, encontrado apenas no genoma dessa bactéria. Os diferentes genes apresentaram capacidades diferentes de detecção e se verificou a ampla distribuição do gênero *Exiguobacterium* na Sibéria. A aplicação da PCR quantitativa também permitiu detectar a presença dessas bactérias em amostras provenientes de solos temperados e tropicais.

## MICROARRANJOS

A aplicação da tecnologia de microarranjos para o estudo de amostras ambientais é um dos recentes e potencialmente promissores avanços na área de ecologia microbiana. Essa tecnologia consiste na hibridização de amostras de ácidos nucléicos marcadas com fluorescência com sondas específicas fixadas em *slides*, os quais podem ser feitos de diferentes materiais, por exemplo, vidro. Uma alta densidade de sondas pode ser colocada em um único *slide* de forma que esse pode conter centenas ou milhares de sondas diferentes. Dessa forma, DNA ou RNA de amostras desconhecidas podem ser hibridizados ao mesmo tempo com sondas específicas para uma grande gama de genes, fornecendo uma grande quantidade de informação em relativamente pouco tempo. Caso ocorra a hibridização de uma sonda com uma seqüência específica do DNA ou RNA alvo, essa é detectada na forma de fluorescência mediante um leitor de raios laser. A intensidade de fluorescência pode ser utilizada como medida de abundância de seqüências no DNA ou RNA alvo. A técnica foi inicialmente desenvolvida para a detecção de seqüências específicas de DNA e para o estudo da expressão gênica. São vantagens dos microarranjos a possibilidade de se examinarem várias amostras de forma rápida e com alta sensibilidade, com baixo custo, automação e baixo nível de ruído de fundo, comparados com a técnica tradicional de hibridização de ácidos nucléicos em membrana porosa.

Existem vários tipos de microarranjos, sendo que alguns deles se aplicam ao estudo de comunidades microbianas do ponto de vista funcional ou filogenético (Zhou, 2003; Wu et al., 2004; Gentry et al., 2006). Dentre aqueles que podem ser aplicados para estudos de ecologia de bactérias, podem ser citados: arranjos de genes funcionais (FGAs), arranjos genômicos de comunidade (CGAs), arranjos de oligonucleotídeos filogenéticos (POAs), arranjos metagenômicos (MGAs) e arranjos de amplificação do genoma total da comunidade (WCGAs).



Os FGAs são caracterizados pela utilização de sondas específicas para genes funcionais, o que permite o monitoramento do estado fisiológico e funcional de amostras ambientais. Os MGAs fornecem informação similar àquela obtida com os FGAs, com a diferença de que, nesse caso, bibliotecas genômicas, e.g. bibliotecas de **cosmídeos**, são utilizadas como sondas. Nos CGAs o DNA genômico de bactérias cultivadas é utilizado como sonda. Nesse caso, não se requer conhecimento prévio das seqüências de genes. Contudo, isso restringe a análise somente aos componentes cultivados da comunidade (Zhou, 2003). Os arranjos de oligonucleotídeos filogenéticos (POAs) são feitos com sondas para genes rRNA e ainda estão em fase de desenvolvimento para a análise de comunidades. Contudo, a detecção específica de genes rRNA é muito difícil devido à sua alta conservação e à sua presença em todas as bactérias. Os WCGAs são bastante recentes e se baseiam na amplificação de DNA genômico de comunidade. Esse tipo de arranjo utiliza a técnica de *rolling circle* PCR, a qual consiste na amplificação de genomas inteiros por meio de PCR (Nallur et al., 2001, citado por Wu et al., 2006). Desse modo, genomas de bactérias presentes em baixa densidade na comunidade e, por isso, abaixo do nível de detecção dos arranjos, podem ser amplificados até um nível em que possam ser detectados.

Na análise de amostras ambientais a alta especificidade das sondas pode impedir a detecção de seqüências muito diferentes de um mesmo gene devido à alta diversidade de seqüências em comunidades microbianas naturais. A especificidade pode ser ajustada por mudanças na **estringência**, tais como mudanças de temperatura de hibridização e adição de formamida. A estringência se caracteriza por condições físico-químicas que dificultam a hibridização de seqüências não-específicas de DNA. Uma análise com menor estringência permitiria a detecção de seqüências com divergência mais ampla enquanto alta estringência pode ser utilizada quando o objetivo é detectar populações mais

específicas (Wu et al., 2001). Estudos indicam que a intensidade de fluorescência pode ser utilizada como uma medida de abundância de sequências (Cho & Tiedje, 2002), porém essa abordagem ainda deve ser vista com cautela, pois a divergência entre seqüências também pode afetar a intensidade de fluorescência detectada. Desse modo, uma determinada seqüência pode apresentar menor fluorescência devido à alta divergência entre ela e a sonda e não devido à sua baixa abundância (Zhou, 2003). As principais limitações para a utilização de microarranjos dizem respeito ao baixo nível de detecção de populações pouco abundantes e à alta especificidade das sondas. Além disso, as sondas existentes são baseadas em seqüências provenientes de organismos cultivados ou de seqüências obtidas por meio de PCR, de modo que espécies não-cultivadas continuam não sendo detectadas.

A aplicação dos microarranjos para o estudo de comunidades é recente e, por isso, a maior parte dos estudos encontrados visou testar e ajustar metodologias para esse fim. Resultados já publicados e comparando a aplicação de microarranjos com técnicas comumente empregadas em estudos de ecologia microbiana mostram a sua aplicabilidade. Por exemplo, Sanguin et al. (2006) detectaram a presença de *Agrobacterium* e bactérias relacionadas na rizosfera de milho com o emprego de microarranjos. Os resultados obtidos por microarranjos foram similares àqueles obtidos com a construção de bibliotecas genômicas. Peplies et al. (2006), utilizando rRNA diretamente extraído da comunidade para hibridização, identificaram diferenças na composição de comunidades de bactérias em sedimentos de quatro rios na Alemanha e indicaram uma baixa diversidade de organismos nos grupos-alvo. Esses resultados foram suportados pela aplicação da técnica de CARD-FISH. Em outro estudo, Neufeld et al. (2006) empregaram microarranjos para estudar comunidades de bactérias em solo contaminado com hexaclorociclohexano (HCH) e compararam os resultados com aqueles obtidos com DGGE. Esses autores hibridizaram RNA

extraído diretamente da comunidade com sondas construídas com base em uma biblioteca de seqüências ribossomais. A determinação da abundância relativa e a identificação dos grupos componentes da comunidade foi possível, e se verificou correlação entre a concentração de HCH e grupos de bactérias consideradas degradadoras desse composto. Amostras não-contaminadas e com baixos teores de HCH apresentaram padrões de hibridização similares, enquanto as amostras com altos teores continham filotipos distintos, mostrando que mudanças na estrutura das comunidades de bactérias ocorreram em função da contaminação com HCH. Resultados similares foram obtidos com DGGE.

#### **EMPREGO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA O ESTUDO DE COMUNIDADES MICROBIANAS DO SOLO NO BRASIL**

Como apresentado, existe uma ampla gama de técnicas disponíveis para avaliação da diversidade de bactérias, as quais estão evoluindo rapidamente, enquanto outras novas estão surgindo. Contudo, poucas delas foram exploradas para o estudo de comunidades de bactérias do solo no Brasil. De fato, conforme observado por Manfio (2003), “há poucos estudos sobre a diversidade de bactérias em ecossistemas brasileiros” e os que existem são “principalmente direcionados ao emprego de metodologias de isolamento e técnicas de cultivo”. De acordo com o autor, o número de grupos taxonômicos estudados é muito limitado. O autor inclui grupos de diferentes áreas além da área de microbiologia do solo. Se considerarmos apenas essa área, o número de estudos é mais reduzido ainda. A aplicação de técnicas independentes de cultivo tem sido crescente na área ambiental, porém está restrita a técnicas e grupos de pesquisa específicos. Contudo, a aplicação das técnicas aqui apresentadas para o estudo da ecologia bacteriana evoluiu nos últimos anos e os estudos existentes revelam uma grande diversidade em solos brasileiros, bem como um potencial para aplicação dessas técnicas para o estudo de comunidades bacterianas nesses solos.

A maioria dos trabalhos encontrados foram publicados após o ano de 2000 sendo, portanto, bastante recentes. Os principais estudos realizados no Brasil e seus resultados são apresentados na tabela 1.1.

Dentre os estudos que avaliaram o perfil de populações ou comunidades, a grande maioria empregou a DGGE como ferramenta para a avaliação da diversidade bacteriana (Gomes et al. 2001; Peixoto et al. 2002; Silva et al. 2003; Evans et al. 2004a; Evans et al. 2004b; Costa et al., 2006; Nogueira et al., 2006; De Oliveira et al., 2006; Peixoto et al. 2006; Souza et al., 2006). Apenas um estudo (Brito et al., 2006) com sedimentos de manguezal empregou o T-RFLP para avaliação da diversidade. Também, Borneman & Triplett (1997) e Yin et al. (2000) utilizaram as técnicas de RISA e construção de bibliotecas genômicas para avaliar a diversidade de bactérias em solos da Amazônia, conforme discutido anteriormente. Como já mencionado um fator importante para a utilização da DGGE é a relativa simplicidade e acessibilidade da técnica. Esses estudos abordam temas como o efeito do cultivo do solo (Costa et al., 2006; Nogueira et al., 2006; Peixoto et al., 2006), populações e comunidades da rizosfera (Gomes et al., 2001; Silva et al., 2003; Costa et al., 2006), bioestimulação (Duarte et al., 2001; Evans et al., 2004a; Evans et al., 2004b) e o desenvolvimento e aplicação de iniciadores para genes alternativos (Peixoto et al., 2002; Mota et al., 2004).

Também foram encontrados estudos que empregaram a construção de bibliotecas genômicas. Esses identificaram mudanças na estrutura e diversidade das comunidades devido à contaminação e utilização do solo (Piza et al., 2004; Pereira et al., 2006; Silveira et al., 2006). Pereira et al. (2006) e Silveira et al. (2006) construíram bibliotecas genômicas com amplicons do gene 16S rRNA para comunidades bacterianas presentes em solos com vegetação nativa e cultivados e verificaram que uma grande diversidade de bactérias estava presente. O cultivo do solo com Eucalipto alterou a composição das

TABELA 1.1 Principais estudos publicados sobre a ecologia de populações e comunidades bacterianas no Brasil que utilizaram as técnicas moleculares abordadas neste capítulo.

Técnicas utilizadas	Objetivo	Material estudado	Principais resultados	Referência
Metodologia para extração indireta de RNA e DNA genômico/DGGE.	Desenvolvimento de metodologia para extração de RNA e de DNA genômico.		Material suficientemente puro para amplificação foi recuperado. Foi possível realizar a amplificação com Taq DNA polimerase (DNA) ou transcriptase reversa e comparar comunidades bacterianas com base em perfis de DGGE.	Duarte et al. (1998)
PCR competitiva.	Desenvolvimento de um sistema para detecção e quantificação de <i>Sphingomonas chlorophenolica</i> .	Amostras de solo de diversas procedências, incluindo o Brasil, foram utilizadas.	O destino de uma estirpe de <i>Sphingomonas chlorophenolica</i> pôde ser acompanhado em amostra contaminada com pentaclorofenol; A bactéria persistiu no solo por período de tempo prolongado, confirmando resultados obtidos por imunofluorescência.	Van Elsas et al. (1998)
PCR/hibridização com sondas específicas.	Detecção de genes catabólicos envolvidos em vias de degradação de hidrocarbonetos e cloroorgânicos.	Solos do Brasil e da Antártida.	Todos os genes estudados, com exceção de um, foram encontrados nos solos estudados, sendo que em maior frequência nos solos da Antártica, de modo geral. Alguns grupos foram mais frequentes em amostras do Brasil.	Luz et al. (2004)
T-RFLP com seqüências de 16S rDNA/culturas de enriquecimento e isolamento de bactérias	Caracterização de comunidades de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos em sedimentos de mangue.	Sedimento marinho coletado em mangues da Baía de Guanabara, RJ, em áreas conservada e poluída com óleo.	Maior diversidade de bactérias foi encontrada na área conservada de mangue, diversidade intermediária foi encontrada em mesocosmos contaminados com petróleo e menor diversidade foi encontrada em perfis de culturas de enriquecimento de ambas as áreas estudadas.	Brito et al. (2006)

TGGE	Estudo de comunidades e bactérias da rizosfera de milho.	Rizosfera de duas cultivares de milho.	A composição da comunidade bacteriana foi similar para ambas as cultivares; Mudanças sazonais na estrutura das populações foram identificadas, sendo que menor complexidade dos perfis foi observada em perfis de plantas jovens; <i>Arthrobacter</i> foi organismo mais abundante em todos os estágios.	Gomes et al. (2001)
DGGE com os gene <i>rpoB</i> e 16S rRNA.	Avaliação do desempenho o gene <i>rpoB</i> como biomarcador.	Solo de cerrado, GO.	Os perfis com o gene <i>rpoB</i> apresentaram menor número de bandas que os perfis com 16S rDNA e os resultados encontrados concordaram entre si, de modo geral. O mesmo agrupamento das amostras foi obtido, porém a similaridades diferentes.	Peixoto et al. (2002)
DGGE/construção de bibliotecas genômicas.	Desenvolvimento e aplicação de sistema de PCR específico para <i>Paenibacillus</i> .	Rizosfera de plantas de milho crescidas em solos de cerrado e de várzea, MG.	Perfis de populações de <i>Paenibacillus</i> da rizosfera de milho em solos de cerrado e várzea foram diferentes; O tipo de solo foi o principal fator determinante da diferença na estrutura das populações, embora uma tendência ao efeito de cultivar tenha sido observada.	Silva et al. (2003)
DGGE	Avaliar o efeito da contaminação do solo com óleo e do processo de bioestimulação.	Amostras de solo contaminado com óleo e bioestimuladas.	Mudanças nas comunidades de bactérias foram observadas em função dos tratamentos; Os resultados indicaram que a adição de nutrientes ao solo levou a uma mudança irreversível nas comunidades de bactérias.	Evans et al. (2004a)
DGGE com gene 16S rRNA	Avaliar o efeito da contaminação do solo com óleo e do	Amostras de solo contaminado com óleo e	Poucas mudanças ocorreram nas comunidades de <i>Pseudomonas</i> spp. durante o experimento;	Evans et al. (2004b)

	processo de bioestimulação.	bioestimuladas.	Bandas adicionais foram detectadas nos tratamentos com óleo e bioestimulação, indicando o efeito destes tratamentos na estimulação de alguns grupos.	
DGGE com gene 16S rRNA/cultivo	Estudo da diversidade de populações de <i>Pseudomonas</i> spp. na rizosfera de milho.	Rizosfera das cultivares de milho Nitroflint e Nitrodent sob cultivo orgânico em Seropédica, RJ.	Os perfis de BOX-PCR dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. revelaram uma alta diversidade genotípica, a qual não foi detectada pela DGGE; A combinação de DGGE com técnicas de cultivo permitiu aos autores relacionar as diversidades estrutural e funcional das populações de <i>Pseudomonas</i> spp.	Costa et al. (2006)
DGGE com espaçador intergênico/construção de bibliotecas genômicas.	Desenvolvimento e aplicação de iniciadores específicos para rizóbios.	Solos cultivados com feijoeiro sob manejo convencional e plantio direto em Guaira, SP.	A especificidade dos iniciadores foi confirmada e a sua utilização juntamente com a análise de DGGE permitiu a diferenciação dos tratamentos com base nos perfis das comunidades.	De Oliveira et al. (2006)
DGGE de seqüências de 16S rDNA associada a técnicas para o estudo de propriedades químicas e microbiológicas do solo.	Avaliar influência do cultivo do solo.	Solo sob vegetação nativa, reflorestamento com espécies nativas, cultivo e em pousio no Paraná.	Menor diversidade em solo sob cultivo e maior diversidade em solos sob floresta e reflorestados com espécies nativas; O padrão de agrupamento dos sítios com base nos resultados da DGGE foi similar àquele obtido com os atributos químicos e microbiológicos do solo.	Nogueira et al. (2006)
DGGE com seqüências dos genes 16S rRNA e <i>rpoB</i> .	Avaliar influência do cultivo do solo.	Solos de cerrado sob manejo convencional e plantio direto, com e sem cobertura de inverno, e solos sob floresta, em	Os sistemas de manejo foram diferenciados com base nos perfis de DGGE; As comunidades do solo sob plantio direto foram mais similares às comunidades do solo sob floresta; A utilização do gene <i>rpoB</i> permitiu uma	Peixoto et al. (2006)

		GO.	melhor visualização das diferenças entre as amostras; Observaram-se diferenças entre amostras coletadas em profundidades diferentes.	
DGGE com o gene 16S rDNA para bactérias e para <i>Vibrio</i> associado a cultivo	Avaliar influência do cultivo do camarão.	Sedimento de áreas de mangue do litoral do Ceará com e sem cultivo de camarão.	Perfis semelhantes foram encontrados para as comunidades de áreas com e sem o cultivo do camarão; Comunidades diferentes de <i>Vibrio</i> estavam associadas aos diferentes mangues estudados.	Sousa et al. (2006)
RISA/crescimento das bactérias em substratos de C contendo bromodeoxiuridina.	Avaliar a redundância funcional de comunidades de bactérias ao longo de um gradiente de degradação do solo.	Solos de área nua de mineração, de área de mineração com vegetação secundária e de floresta na Floresta Nacional de Jamari, RO	O número e diversidade de grupos crescendo nos diferentes substratos testados aumentou ao longo do gradiente com a floresta apresentando a maior diversidade. Os resultados indicaram que a redundância funcional das comunidades aumentou devido à revegetação do solo degradado.	Yin et al. (2000)
Bibliotecas genômicas com seqüências do gene 16S rRNA e RISA.	Avaliar influência do cultivo do solo.	Solos sob floresta e pastagem na Amazônia Oriental.	Foi observada uma alta diversidade de seqüências; As populações do solo de floresta e pastagem diferiram entre si e um número maior de organismos não-identificados foi encontrado no solo sob floresta.	Borneman & Triplett (1997)
Bibliotecas genômicas com o gene 16S rRNA.	Caracterização da diversidade microbiana presente em sedimentos de estuários.	Sedimentos de dois sítios localizados no estuário Santos-São Vicente, SP.	Diferenças na diversidade e na composição das comunidades estudadas foram observadas e o sítio contaminado com hidrocarbonetos apresentou a menor diversidade.	Piza et al. (2004)



Bibliotecas genômicas com o gene 16S rRNA.	Avaliar influência do cultivo do solo.	Solo sob floresta e cultivado com eucalipto localizados em Jaboticabal, SP.	Foram encontradas várias seqüências de bactérias não-cultivadas pertencentes a vários filos; Diferenças na diversidade e na composição das comunidades estudadas foram observadas e o solo cultivado com eucalipto apresentou maior diversidade;	Silveira et al. (2006)
Bibliotecas genômicas com o gene 16S rRNA.	Avaliar influência do cultivo do solo.	Solo sob floresta e solo cultivado com tomate, feijão e milho, localizados em Guaira, SP.	Foram encontradas várias seqüências de bactérias não-cultivadas pertencentes a vários filos; Observou-se maior diversidade em solo sob floresta; Um maior número de seqüências de Acidobacteria e Verrucomicrobia e um menor número de seqüências de Firmicutes foram encontrados na floresta.	Pereira et al. (2006)
Pirosequenciamento	Estimar a diversidade de bactérias em solos e determinar variações dessas estimativas em diferentes escalas geográficas.	Solos da Flórida, Illinois, Brasil e Canadá.	Estimativas do número de UTOs presentes nos solos estudados variam entre 11.803 e 51276 UTOs definidas a 0% de similaridade entre as seqüências de 16S rDNA; A floresta boreal apresentou maior diversidade no nível de similaridade utilizado para definição de filos e os solos agrícolas apresentaram maior diversidade no nível de similaridade utilizado para definição de espécie; A sub-divisão gamaproteobactéria foi dominante no solo do Brasil.	Roesch et al. (2007)

comunidades e até mesmo estimulou o aumento na diversidade, conforme verificado por Silveira et al. (2006), além de estimular populações de actinomicetos. Piza et al. (2004) também verificaram alterações na composição de comunidades de bactérias, porém em outro ambiente, um manguezal do litoral de São Paulo, devido à contaminação com hidrocarbonetos, onde populações de *Actinobacteria* (muitas delas representantes de grupos já cultivados) foram mais abundantes que em sedimentos não-contaminados. Recentemente, Roesch et al. (2007) utilizaram o pirosequenciamento para estudar a diversidade de bactérias em solos agrícolas e com vegetação nativa, incluindo solo de uma área cultivada com milho no sul do Brasil. Foram encontradas 5.658 unidades taxonômicas operacionais e as estimativas do número de unidades taxonômicas operacionais existentes nesse solo variaram entre 11.803 a 23.396 unidades taxonômicas, em função do índice utilizado.

A maior parte dos estudos teve como objetivo detectar mudanças na diversidade e estrutura das comunidades de bactérias em função do uso diferenciado da terra e da contaminação do solo e sedimentos. De modo geral, quase todos verificaram mudanças em função dos tratamentos, podendo-se concluir que as técnicas empregadas foram sensíveis para detecção de mudanças na estrutura das populações e comunidades bacterianas estudadas. Além das técnicas apresentadas acima, artigos desenvolvendo metodologias para o estudo de comunidades (Peixoto et al., 2002; Oliveira et al., 2006; Van Elsas et al., 1998) bem como para a extração de RNA e DNA (Duarte et al., 1998) foram encontrados.

#### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As diversas técnicas de biologia molecular apresentadas têm contribuído para melhor compreensão das populações e comunidades de bactérias, a qual não seria possível com os antigos métodos de cultivo. Novos grupos foram

descobertos e mudanças na estrutura das comunidades puderam ser estudadas. Atualmente, dois grandes desafios se apresentam: fazer a ligação entre o conhecimento filogenético e funções realizadas por esses organismos; e o cultivo da imensa gama de bactérias não-cultivadas. A metade dos filos conhecidos não tem representantes cultivados (Rappé & Giovannoni, 2003) e, assim, pouco ou nada se sabe sobre a fisiologia e função desses grupos no ambiente. Estudos baseados em genes rRNA fornecem informação sobre a constituição filogenética da comunidade, porém pouco é fornecido sobre suas funções. Algumas inferências podem ser feitas para espécies e grupos cuja função já é conhecida com base em informação filogenética, mas pouco ainda se conhece sobre funções de um grande número dessas espécies. O cultivo é necessário para que estudos de fisiologia e metabolismo sejam realizados, para a própria aplicação biotecnológica desses organismos e para a compreensão do seu papel ecológico.

O desenvolvimento de técnicas abordando genes funcionais, e.g. os microarranjos de genes funcionais são um passo importante para a compreensão das funções exercidas por comunidades microbianas no ambiente. As técnicas apresentadas podem ser ligadas a estudos com genes funcionais e a metodologias que possibilitam os estudos de comunidades e populações específicas, e.g. a análise de DNA fracionado com base na %G+C, como já comentado, e sondagem com isotópos estáveis (SIP).

Como apresentado, existem várias técnicas moleculares para o estudo da diversidade de bactérias em solos. Essas técnicas têm sido melhoradas e novas técnicas têm surgido, de modo que constituem-se em ferramentas importantes para o melhor conhecimento da ecologia bacteriana. Estudos no Brasil, com a sua grande variedade de solos e ecossistemas, têm um grande potencial para contribuir com esse conhecimento, e a aplicação dessas técnicas ao nosso contexto deve ser estimulada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDO, Z.; SCHÜETTE, U. M. E.; BENT, S. J.; WILLIAMS, C. J.; FORNEY, L. J.; JOYCE, P. Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. **Environmental Microbiology**, v.8, p.929–938, 2006.

ACINAS, S. G.; SARMA-RUPAVTARM, R.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M. F. PCR-Induced Sequence Artifacts and Bias: Insights from Comparison of Two 16S rRNA Clone Libraries Constructed from the Same Sample. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.8966–8969, 2005.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF., M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 3<sup>rd</sup>ed. New York: Garland, 1994. 1294p.

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

AVRAHAMI, S.; CONRAD, R.; BRAKER, G. Effect of soil ammonium concentration on N<sub>2</sub>O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.5685-5692, 2002.

BACKMAN, J. S. K.; HERMANSSONA, A.; TEBBE, C. C.; LINDGRENA, P. E. Liming induces growth of a diverse flora of ammonia-oxidizing bacteria in acid spruce forest soil as determined by SSCP and DGGE. **Soil Biology & Biochemistry**, v.35, p.1337–1347, 2003.

BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; WHEELER, D. L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, n.33, D34–D38, 2005. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

BLACKWOOD, C. B.; PAUL, E. A. Eubacterial community structure and population size within the soil light fraction, rhizosphere, and heavy fraction of several agricultural systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v.35, p.1245-1255, 2003.

BLACKWOOD, C. B.; BUYER, J. S. Evaluating the physical capture method of terminal restriction fragment length polymorphism for comparison of soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p.590-599, 2007.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.2647-2653, 1997.

BRAKER, G.; AYALA-DEL-RÍO, H. L.; DEVOL, A. H.; FESEFELDT, A.; TIEDJE, J. M. Community Structure of Denitrifiers, *Bacteria*, and *Archaea* along Redox Gradients in Pacific Northwest Marine Sediments by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Nitrite Reductase (*nirS*) and 16S rRNA Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.1893-1901, 2001

BRITO, E. M. S.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; VERBAERE, A.; CRAPEZ, M. A.C.; WASSERMAN, J. C. A.; DURAN, R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in Microbiology**, v.157, p.752-762, 2006.

BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **Journal of biomolecular techniques**, v.15, p.155-166, 2004.

CHO, J. C.; TIEDJE, J. M. Quantitative detection of microbial genes by using DNA microarrays. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1425-1430, 2002.

CHUN, J.; HUQ, A.; COLWELL, R. R. Analysis of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.5, p.2202-2208, 1999.

COLE, J. R.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S.; MCGARRELL, D. M.; BANDELA, A. M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, n.35, D169-D172, 2007. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

COSTA, R.; GOMES, C.M.; PEIXOTO, R. S.; RUMJANEK, N.; BERG, G.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; SMALLA, K. Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.2434-2447, 2006.

MOTA, F.F. da; GOMES, E.A.; PAIVA, E.; ROSADO, A. S.; SELDIN, L. Use of rpoB gene analysis for identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species as an alternative to the 16S rRNA gene. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, p.34-40, 2004.

SILVA, K. R. A. da; SALLES, J. F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. **Journal of Microbiological Methods**, v.54, p.213– 231, 2003.

SILVEIRA, E.L. da; PEREIRA, R.M.; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L. M.; LEMOS, E. G. D. M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1507-1516, 2006.

OLIVEIRA, V. M. de; MANFIO, G. P. ; COUTINHO, H. L. DA C.; KEIJZER-WOLTERS, A. C.; VAN ELSAS, J. D. A ribosomal RNA gene intergenic spacer based PCR and DGGE fingerprinting method for the analysis of specific rhizobial communities in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v.64, p.366-379, 2006.

DUARTE, G. F.; ROSADO, A. S.; SELDIN, L.; KEIJZER-WOLTERS, A. C.; VAN ELSAS, J. D. Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community. **Journal of Microbiological Methods**, v.32, p.21-29, 1998.

DUARTE, G. F.; ROSADO, A. S.; SELDIN, L.; ARAUJO, W. de; VAN ELSAS, J. D. Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzoathiofene desulfurization (dsz) genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.3, p.1052-1062, 2001.

DUBEY, S. K.; TRIPATHI, A. K.; UPADHYAY, S. N. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. **Bioresource Technology**, v.97, p.2217–2224, 2006.

DWORKIN, M. (Ed.) **The Prokaryotes**. 1999-2005. Disponível em: <<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>>. Acesso em: 3 abr. 2006.

ETSCHIED, M.; RIESNER, D. TGGE and DGGE. In: KARP, A.; ISAAC, P. G.; INGRAM, D. S. **Molecular tools for screening biodiversity**. London: Chapman & Hall, 1998. p.135-143,

EVANS, F. F.; ROSADO, A. S.; SEBASTIAN, G.V. ; CASELLA, R.; MACHADO, P. L. O. A.; HOLMSTRÖM, C.; KJELLEBERG, S.; VAN ELSAS, L. D.; SELDIN, L. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. **FEMS Microbiology Ecology**, v.49, p.295-305, 2004a.

EVANS, F. F. ; SELDIN, L.; SEBASTIAN, G. V. ; KJELLEBERG, S.; HOLMSTROM, C.; ROSADO, A. S. Influence of petroleum contamination and biostimulation treatment on the diversity of *Pseudomonas* spp. in soil microcosms as evaluated by 16S rRNA based-PCR and DGGE. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, p.93–98, 2004b.

FISHER, M. M.; TRIPLETT, E. W. Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. **Applied And Environmental Microbiology**, v.65, p.4630–4636, 1999.

FROSTEGÅRD, A.; OURTOIS, S.; RAMISSE, V.; CLERC, S.; BERNILLON, D.; LE GALL, F.; JEANNIN, P.; NESME, X.; SIMONET, P. Quantification of Bias Related to the Extraction of DNA Directly from Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.5409-5420, 1999.

FUHRMAN, J. A.; HEWSON, I.; SCHWALBACH, M. S.; STEELE, J. A.; BROWN, M. V.; NAEEM, S. Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, p.13104-13109, 2006.

GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, v.309, p.1387-1390, 2005.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; ACINAS, S. G.; ANTÓN, A. I.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Use of 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v.36, p.55-64, 1999.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; BESCOÏS, I.; RODRÍGUEZ-SALA, J. J.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. RISSC.: A novel database for ribosomal 16S-23S RNA genes spacer regions. **Nucleic Acids Research**, v.29, p.178-180, 2001.

GENTRY, T. J.; WICKHAM, G.S.; SCHADT, C.W.; HE, Z.; ZHOU, J. Microarray Applications in Microbial Ecology Research. **Microbial Ecology**, v.52, p.159–175, 2006.

GIOVANNONI, S. J. New approaches to the cultivation of microorganisms: Winogradsky revisited. In: **10<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology – ISME-10 –Book of abstracts**, Cancún, Mexico: 2004. p.1.

GOMES, N. C. M.; HEUER, H.; SCHÖNFELD, J.; COSTA, R.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, v.232, p.167–180, 2001.

GROS, R.; POLY, F.; MONROZIER, L. J.; FAIVRE, P. Plant and soil microbial community responses to solid waste leachates diffusion on grassland. **Plant and Soil**, v.255, p.445–455, 2003.

HENRY, S.; BAUDOIN, E.; LÓPEZ-GUTIÉRREZ, J. C.; MARTIN-LAURENT, F.; BRAUMAN, A.; PHILIPPOT, L. Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v.59, p.327– 335, 2004.

HERMANSSON, A.; LINDGREN, P. E. Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Arable Soil by Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.972–976, 2001.

HILL, G. T.; MITKOWSKI, N. A.; ALDRICH-WOLFE, L.; EMELE, L. R.; JURKONIE, D. D.; FICKE, A.; MALDONATO-RAMIREZ, S.; LYNCH, S. T.; NELSON, E. B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v.15, p.25-36, 2000.

HILLEL, D. **Introduction to soil physics**. San Diego: Academic, 1982. 364 p.



HOLBEN, W. E.; HARRIS, D. DNA-based monitoring of total bacterial community structure in environmental samples. **Molecular Ecology**, v.4, p.627-631, 1995.

HORZ, H. P.; ROTTHAUWE, J. H.; LUKOW, T.; LIESACK, W. Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of *amoA* PCR products. **Journal of Microbiological Methods**, v.39, p.197-204, 2000.

HORZ, H. P.; YIMGA, M. T.; LIESACK, W. Detection of Methanotroph Diversity on Roots of Submerged Rice Plants by Molecular Retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and Ribosomal DNA, Including *pmoA*-Based Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.4177-4185, 2001.

HUANG, P. M.; WANG, M. K.; KAMPF, N.; SCHULZE, D. G. Aluminum Hydroxides. **Soil Mineralogy with Environmental Applications**, SSSA Book Series, n. 7, p.261-289, 2002.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.4765-4774, 1998.

HUGHES, J. B.; HELLMANN, J. J.; RICKETTS, T. H. & BOHANNAN, J. M. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.4399-4406, 2001.

INSAM, H. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. **Geoderma**, v.100, p.389-402, 2001.

KAMPF, N.; CURTI, N. Argilominerais em solos brasileiros. **Tópicos em ciência do solo**, v.1, p.1-54, 2000a.

KAMPF, N.; CURTI, N. Óxidos de ferro: indicadores de ambientes pedogênicos e geoquímicos. **Tópicos em Ciência do Solo**, v.1, p.107-138, 2000b.

KEMP, P. F.; ALLER, J. Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. **FEMS Microbiology Ecology**, v.47, p.161-177, 2004.

KENT, A. D.; SMITH, D. J.; BENSON, B. J.; TRIPLETT, E. W. Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment polymorphism profiles of microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.6168-6776, 2003.

KING, S.; MCCORDA, B. R.; RIEFLERB, R. G. Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism analysis for monitoring soil bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v.60, p.83–92, 2005.

KLAPPENBACH, J.A.; DUNBAR, J.M.; SCHMIDT, T.M. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.1328-1333, 2000.

LANE, D. J. 16/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester/New York: J.Wiley, 1991. p.115-175.

LEE, D. H.; ZO, Y. Z.; KIM, S. J. Nonradioactive Method To Study Genetic Profiles of Natural Bacterial Communities by PCR–Single-Strand-Conformation Polymorphism. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.3112–3120, 1996.

LEJON, D. P. H.; CHAUSSOD, R.; RANGER, J.; RANJARD, L. Microbial Community Structure and Density Under Different Tree Species in an Acid Forest Soil (Morvan, France). **Microbial Ecology**, v.50, p.614–625, 2005.

LERAT, S.; ENGLAND, L. S.; VINCENT, M. L.; PAULS, K. P.; SWANTON, C. J.; KLIRONOMOS, J. N.; TREVORS, J. T. Real-time polymerase chain reaction (PCR) quantification of the transgenes for Roundup ready corn and Roundup ready soybean in soil samples. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.53, p.1337–1342, 2005.

LIU, W.; MARSH, T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4516-4522, 1997.

LÓPEZ-GUTIÉRREZ, J. C.; HENRY, S.; HALLET, S.; MARTIN-LAURENT, F.; CATROUX, G.; PHILIPPOT, L. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v.57, p.399–407, 2004.

LOUGHNEY, K.; LUND, E.; DAHLBERG, J.E. tRNA genes are found between the 16S and 23S rRNA genes in *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Research**, v.10, p.1607–1624,1982.

LOZUPONE, C., HAMADY, M.; KNIGHT, R. UniFrac – An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. **BMC Bioinformatics**, v.7, p.371, 2006.

LUZ, A. P.; PELLIZARI, V. H.; WHYTE L. G. A survey of indigenous microbial hydrocarbon degradation genes in soils from Antarctica and Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.323-333, 2004.

MACGREGOR, B.J.; AMANN, R. Single-stranded conformational polymorphism for separation of mixed rRNAs (rRNA-SSCP), a new method for profiling microbial communities. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.661-670, 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. **Brock Biology of microorganisms**. Eleventh edition, Pearson Prentice Hall, 2006. 992p.

MANFIO, G. P. **Microbiota, versão preliminar. Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil**. COBIO/MMA – GTB/CNPq – NEPAM/UNICAMP, 2003.

MARCHESI, J.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A. J.; MARTIN, T. A.; FRY, J. C.; HIOM, S. J.; WADE, W. G. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, v.64, p.795–799, 1998.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v.437, p.376-380, 2005.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A. et al. Corrigendum: Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v.441, p.120, 2006.

MARSH, T. L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): and emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. **Current Opinion in Microbiology**, v.2, p.323-327, 1999.

MARSH, T. L. Culture-Independent Microbial Community Analysis with Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism. **Methods in Enzymology**, 397, p.308-329, 2005.

MARSH, T. L.; SAXMAN, P.; COLE, J.; TIEDJE, J. M. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Program, a Web-Based Research Tool for Microbial Community Analysis. **Applied and environmental microbiology**, v.66, p.3616–3620, 2000.

MOESENEDER, M. M.; ARRIETA, J. M.; MUYZER, G.; WINTER, C.; HERNDL, G. J. Optimization of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Complex Marine Bacterioplankton Communities and Comparison with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.3518-3525, 1999.

MORÉ, M. I.; HERRICK, J. B.; SILVA, M. C.; GHIORSE, W. C.; MADSEN, E. L. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.1572–1580, 1994.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MULLIS, K.; FALLONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro – the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v.51, p.263-273, 1986.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.695–700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v.73, p.127-141, 1998.

MYERS, R. M.; FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v.13, p.3131-3145, 1985.

NAKANO, Y.; TAKESHITA, T.; YAMASHITA, Y. TRFMA: a Web-based tool for terminal restriction fragment length polymorphism analysis based on molecular weight. **Bioinformatics Advance Access**, p.1-2, 2006. Disponível em: <<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/btl186v1>>. Acesso em: 15 dez. 2007.

NALLUR, G.; LUO, C.; FANG, L.; COOLEY, S.; DAVE, V.; LAMBERT, J.; KUKANSKIS, K.; KINGSMORE, S.; LASKEN, R.; SCHWEITZER, B. Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays. **Nucleic Acids Research**, v.29, e118, 2001. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

NEUFELD J. D.; MOHN, W. W.; DE LORENZO, V. Composition of microbial communities in hexachlorocyclohexane (HCH) contaminated soils from Spain revealed with a habitat-specific microarray. **Environmental Microbiology**, v.8, p.126–140, 2006.

NEWTON, R. J.; KENT, A. D.; TRIPLETT, E. W.; MCMAHON, K. D. Microbial community dynamics in a humic lake: differential persistence of common freshwater phylotypes. **Environmental Microbiology**, v.8, p.956–970, 2006.

NOGUEIRA, M. A.; ALBINO, U. B.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; BRAUN, G.; CRUZ, M. F.; DIAS, B. A.; DUARTE, R. T. D.; GIOPPO, N. M. R.; MENNA, P.; ORLANDI, J. M.; RAIMAM, M. P.; RAMPAZO, L. G. L.; SANTOS, M. A.; SILVA, M. E. Z.; VIEIRA, F. P.; TOREZAN, J. M. D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, G. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.115, p.237-247, 2006.

NOGUEZ, A. M.; ARITA, H. T.; ESCALANTE, A. E.; FORNEY, L. J.; GARCÍA-OLIVA, F.; SOUZA, V. Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest. **Global Ecology and Biogeography**, v.14, p.241–248, 2005.

NUSSLEIN, K.; TIEDJE, J. M. Soil Bacterial Community Shift Correlated with Change from Forest to Pasture Vegetation in a Tropical Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.3622-3626, 1999.

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as Single-Strand. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.86, p.2766-2770, 1989.

PEIXOTO, R. S.; COUTINHO, H. L. C.; MADARI, B.; MACHADO, P. L. O. A.; RUMJANEK, N. G.; VAN ELSAS, J. D.; SELDIN, L.; ROSADO, A. S. Soil aggregation and bacterial community structure as affected by tillage and cover cropping in the Brazilian Cerrados. **Soil & Tillage Research**, v.90, p.16–28, 2006.

PEIXOTO, R. S.; COUTINHO, H. L. C.; RUMJANEK, N. G.; MACRAE, A.; ROSADO, A. S. Use of *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, p.316–320, 2002.

PEPLIES J.; LACHMUND, C.; GLÖCKNER, F. O.; MANZ, W. A DNA Microarray Platform Based on Direct Detection of rRNA for Characterization of Freshwater Sediment-Related Prokaryotic Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.4829–4838, 2006.

PEREIRA, R. M.; DA SILVEIRA, E. L.; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L. M.; LEMOS, E. G. D. M. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.439-447, 2006.

PIZA, F. F.; PRADO, P. I.; MANFIO, G. P. Investigation of bacterial diversity in Brazilian tropical estuarine sediments reveals high actinobacterial diversity. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.86, p.317–328, 2004.

POLZ, M. F.; CAVANAUGH, C. M. Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3724–3730, 1998.

RANJARD, L.; POLY, F.; LATA, J.-C.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; NAZARET, S. Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.4479–4487, 2001.

RANJARD, L.; ECHAIRI, A.; NOWAK, V.; LEJON, D. P. H.; NOUAIM, R.; CHAUSSOD, R. Field and microcosm experiments to evaluate the effects of agricultural Cu treatment on the density and genetic structure of microbial communities in two different soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v.58, p.303–315, 2006.

RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 369-394, 2003.

RODRIGUES, J. L. M.; AIELLO, M. R.; URBANCE, J. W.; TSOI, T. V.; TIEDJE, J. M. Use of both 16S rRNA and engineered functional genes with real-time PCR to quantify an engineered, PCB-degrading *Rhodococcus* in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v.51, p.181–189, 2002.

RODRIGUES, D. F.; TIEDJE, J. M. Multi-locus real-time PCR for quantitation of bacteria in the environment reveals *Exiguobacterium* to be prevalent in permafrost. **FEMS Microbiology Ecology**, v.59, p.489–499, 2007.

ROESCH, L. G. W.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K. M.; KENT, A. D.; DAROUB, S. H.; CAMARGO, F. A. O.; FARMERIE, W. G.; TRIPLETT, E. W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, v.1, p.283-290, 2007.

SALEH-LAKHA, S.; MILLER, M.; CAMPBELL, R. G.; SCHNEIDER, K.; ELAHIMANESH, P.; HART, M. M.; TREVORS, J. T. Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. **Journal of Microbiological Methods**, v.63, p.1-9, 2005.

SANDAA, R. A.; TORSVIK, V.; ENGER, O.; DAAE, F. L.; CASTBERG, T.; HAHN, D. Analysis of bacterial communities in heavy-metal contaminated soils at different levels of resolution. **FEMS Microbiology Ecology**, v.30, p.237-251, 1999.

SANGUIN, H.; HERRERA, A.; OGER-DESFEUX, C.; DECHESNE, A.; SIMONET, P.; NAVARRO, E.; VOGEL, T. M.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; NESME, X.; GRUNDMANN, G. L. Development and validation of a prototype 16S rRNA-based taxonomic microarray for *Alphaproteobacteria*. **Environmental Microbiology**, v.8, p.289–307, 2006.

SANTO DOMINGO, J. W.; KAUFMAN, M. G.; KLUG, M. J.; HOLBEN, W. E.; HARRIS, D.; TIEDJE, J. M. Influence of diet on the structure and function of the bacterial hindgut community of crickets. **Molecular Ecology**, v.7, p.761-767, 1998.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.1501-1506, 2005.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing treeclimber, a test to compare microbial community structures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.2379–2384, 2006a

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.673–6779, 2006b.

SCHLOSS, P. D.; LARGETE, B. R.; HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.5485-5492, 2004.

SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. **Applied and environmental microbiology**, v.64, p.4870-4876, 1998.

SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. Effect of Field Inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the Composition of Bacterial Communities in Rhizospheres of a Target Plant (*Medicago sativa*) and a Non-Target Plant (*Chenopodium album*)—Linking of 16S rRNA Gene-Based Single-Strand Conformation Polymorphism Community Profiles to the Diversity of Cultivated Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3556–3565, 2000.



SEGHERS, D.; VERTHÉ, K. A.; REHEUL, D.; BULCKE, R.; SICILIANO, S. D.; VERSTRAETE, W.; TOP, E. M. Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v.46, p.139-146, 2003.

SINGLETON, D. R.; FURLONG, M. A.; RATHBUN, S. L.; WHITMAN, W. B. Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.4374-4376, 2001.

SMALLA, K.; CRESSWELL, N.; MENDONCA-HAGLER, L.; WOLTERS, A.; VAN ELSAS, D. J. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. **Journal of Applied Bacteriology**, v.74, p.78-85, 1993.

SMALLA, K.; OROS-SICHLER, M.; MILLING, A.; HEUER, H.; BAUMGARTE, S.; BECKER, R.; NEUBER, G.; KROPF, S.; ULRICH, A.; TEBBE, C. C. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? **Journal of Microbiological Methods**, v.69, p.470-479, 2007.

SMITH, C. J.; DANILOWICZ, B. S.; CLEAR, A. K.; COSTELLO, F. J.; WILSON, B.; MEIJER, W. G. T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, p.375-380, 2005.

SOUZA, O. V.; MACRAE, A.; MENEZES, F. G. R.; GOMES, N. C. M.; VIEIRA, R. H. S. F.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v.52, p.1725-1734, 2006.

STRES, B.; MAHNE, I.; AVGUSTIN, G.; TIEDJE, J. M. Nitrous Oxide Reductase (*nosZ*) Gene Fragments Differ between Native and Cultivated Michigan Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.301-309, 2004.

SUZUKI, M. T.; GIOVANNONI, S. J. Bias Caused by Template Annealing in the Amplification of Mixtures of 16S rRNA Genes by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.625-630, 1996.

SUZUKI, M. T.; RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.4522–4529, 1998.

TIEDJE, J. M.; ASUMING-BREMPOG, S.; NUSSLEIN, K.; MARSH, T. L.; FLYNN, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, v.13, p.109-122, 1999.

TRINGE, S. G.; RUBIN, E. M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. **Nature Reviews Genetics**, v.6, p.805-814, 2005.

TRINGE, S. G.; VON MERING, C. KOBAYASHI, A.; SALAMOV, A. A.; CHEN, K.; CHANG, H. W.; PODAR, M.; SHORT, J. M.; MATHUR, E. J.; DETTER, J. C.; BPRK, P.; HUGENHOLTZ, P.; RUBIN, E. M. Comparative Metagenomics of Microbial Communities. **Science**, v.308, p.554-557, 2005.

TORSVIK, V. Diversity of microbial communities determined by DNA analysis. In: RITZ, K.; DIGHTON, J.; GILLER, K. (Ed.). **Beyond biomass**. [S.l.]: Willey Exeter, 1994. p. 39-48.

TYSON, G.; CHAPMAN, J.; HUGENHOLTZ, P.; ALLEN, E. E.; RAM, R. J.; RICHARDSON, P. M.; SOLOVYEV, V. V. RUBIN, E. M.; ROKHSAR, D. S.; BANFIELD, J. F. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, v.428, p.37-43, 2004.

VAN ELSAS, J. D.; BRONS, J. K.; DE VOS, G.; HACKAERT, R. High-throughput bacterial community fingerprinting using capillary technology. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 11., 2006, Vienna. **Book of Abstracts...** Vienna, Austria, 2006. p.A137, 2006.

VAN ELSAS, J. D.; ROSADO, A. S.; WOLTERS, A. C.; MOORE, E.; KARLSON, U. Quantitative detection of *Spingomonas chlorophenolica* in soil via competitive polymerase chain reaction. **Journal of Applied Ecology**, v.85, p.463-471, 1998.

VENTER, J. C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J. F.; HALPERN, A. L.; RUSCH, D.; EISEN, J. A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K. E.; NELSON, W.; FOUTS, D. E.; LEVY, S.; KNAP, A. H.; LOMAS, M. W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKUCH, C.; ROGERS, Y. H.; SMITH, O. H. Environmental genome shotgun sequencing of the sargasso sea. **Science**, v.304, p.66-74, 2004.

WALLENSTEIN, M. D.; VILGALYS, J. R. Quantitative analyses of nitrogen cycling genes in soils. **Pedobiologia**, v.49, p.665-672, 2005.

WIDMER, F.; HARTMANN, M.; FREY, B.; KÖLLIKER, R. A novel strategy to extract specific phylogenetic sequence information from community T-RFLP. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, p.512-520, 2006.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v.51, p.221-271, 1987.

WOLSING, M.; PRIEMÉ, A. Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of nir gene fragments. **FEMS Microbiology Ecology**, v.48, p.261-271, 2004.

WU, L.; THOMPSON, D. K.; LI, G.; HURT, R. A.; TIEDJE, J. M.; ZHOU, J. Development and Evaluation of Functional Gene Arrays for Detection of Selected Genes in the Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.5780-5790, 2001.

WU, L.; THOMPSON, D. K.; LIU, X.; FIELDS, M.; BAGWELL, C.; TIEDJE, J. M.; ZHOU, J. Development and Evaluation of Microarray-Based Whole-Genome Hybridization for Detection of Microorganisms within the Context of Environmental Applications. **Environmental Science Technology**, v.38, p.6775-6782, 2004.

WU, L.; LIU, X.; SCHADT, C. W.; ZHOU, J. Microarray-Based Analysis of Subnanogram Quantities of Microbial Community DNAs by Using Whole-Community Genome Amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.4931-4941, 2006.

YEATES, C.; GILLINGS M. R.; DAVISON, A. D.; ALTAVILLA, N.; VEAL, D. A. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. **Biological Procedures Online**, v. 1, n. 1, 1998. Disponível em: <[www.biologicalprocedures.com](http://www.biologicalprocedures.com)>. Acesso em: 25 maio 2007.

YIN, B.; CROWLEY, D.; SPAROVEK, G.; DE MELO, W. J.; BORNEMAN, J. Bacterial Functional Redundancy along a Soil Reclamation Gradient. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.4361–4365, 2000.

ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.70, p.281–289, 2006.

ZHOU, J. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, p.288–294, 2003.

ZHOU, J.; BRUNS, M. A.; TIEDJE, J. M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.316-322, 1996.

## CHAPTER 3

### LAND USE CHANGES THE STRUCTURE OF SOIL BACTERIAL COMMUNITIES IN THE WESTERN AMAZON

#### ABSTRACT

Soil bacterial communities play a key role in several ecosystem functions. Land use may change their structure and, consequently, affect the functioning of the processes they perform. However, there are still few studies showing if and how this change occurs, especially in tropical regions such as in Amazon, which is considered as one of the most diverse ecosystems in the world. Within this context, our objective was to study the effect of land use and soil attributes on the structure and diversity of overall bacterial communities in Western Amazonian soils. To do so, we explored community composition and diversity using the 16S rRNA gene by T-RFLP, cloning and sequencing. Soil samples were collected in the community Guanabara II and in the Benjamin Constant city, AM, Brazil, in different land use systems (LUS) comprising Pasture, Agriculture, Agroforestry, Young Secondary Forest, Old Secondary Forest and Primary Forest. Data were analyzed with multivariate techniques and diversity indices were also calculated. Highly diverse communities were found in all LUS and Pasture communities were ranked as the most diverse. The main differences between bacterial communities were observed in their structure. We found that these differences were related to changes in the soil attributes which, in turn, were correlated to land use. The structure of communities changed significantly along gradients of base saturation,  $[Al^{+3}]$  and pH. Soil attributes accounted for about 31% of the variation of the studied communities, showing that the distribution of bacteria in these communities is linked to edaphic factors, and indicating that land use, through its influence on soil attributes, was a significant factor determining the structure of bacterial communities in the studied soils. Clear differences were observed in community composition. The majority of the sequences matched with sequences of uncultured bacteria. Acidobacteria and Proteobacteria were the most abundant phyla and groups inside them were distributed differently among the LUS. A larger number of Bacteroidetes sequences were observed in cultivated sites. In turn, Firmicutes and Actinobacteria sequences were more numerous in the Forest and Old Secondary Forest. We can conclude that land use was an important factor to the differentiation of bacterial communities and that these differences are linked to changes in the soil attributes.

## USO DA TERRA ALTERA A ESTRUTURA DE COMUNIDADES DE BACTÉRIAS DO SOLO DA AMAZÔNIA OCIDENTAL

### RESUMO

Comunidades de bactérias do solo tem um papel chave em várias funções do ecossistema. O uso da terra pode alterar a estrutura dessas comunidades e, conseqüentemente, afetar as funções por elas realizadas. Contudo, ainda existem poucos estudos mostrando se existem e como ocorrem essas mudanças, especialmente em regiões tropicais como a Amazônia, a qual é considerada como um dos ecossistemas mais diversos do mundo. Assim, nosso objetivo foi estudar o efeito do uso da terra e dos atributos do solo na estrutura e diversidade de comunidades de bactérias em solos da Amazônia Ocidental. A composição e a diversidade das comunidades foram exploradas por T-RFLP, clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA. Amostras de solo foram coletadas na comunidade Guanabara II e na sede de Benjamin Constant, AM, nos seguintes sistemas de uso da terra (SUT): pastagem, agricultura, agrofloresta, capoeira nova, capoeira velha e floresta primária. Análises multivariadas e índices de diversidade foram empregados. Comunidades com alta diversidade foram observadas em todos os SUTs, sendo que as comunidades de pastagem foram as mais diversas, e as principais diferenças foram verificadas na estrutura das comunidades. Essas diferenças estavam relacionadas a mudanças nos atributos do solo as quais, por sua vez, se relacionaram com o uso da terra. A estrutura das comunidades mudou significativamente ao longo de gradientes de saturação de bases,  $[Al^{+3}]$  e pH. Cerca de 31% da variação observada nas comunidades estudadas se deve aos atributos do solo, demonstrando que a distribuição das bactérias está relacionada a fatores edáficos, e indicando que o uso da terra, através de sua influência nos atributos do solo, foi um fator significativo. Diferenças claras foram observadas na composição das comunidades. A maioria das seqüências apresentou maior identidade com seqüências de organismos não cultivados. Acidobacteria e Proteobacteria foram os filos mais abundantes e grupos dentro desses filos se distribuíram diferencialmente entre os SUTs. Maior número de seqüências de Bacteroidetes foi encontrado em áreas de cultivo, enquanto maior número de seqüências de Firmicutes e Actinobacteria foi encontrado nas áreas de Floresta e Capoeira. Conclui-se que o uso da terra foi um fator importante na diferenciação das comunidades e que estas mudanças estão ligadas a alterações nos atributos do solo.

## 1 INTRODUCTION

The Amazon is one of the main hotspots of world's biodiversity. The region is far from being homogeneous and harbors a great diversity of natural environments and social groups. The search for alternatives able to reach and link goals such as preservation, sustainability, economic development and the social needs of human communities requires research addressing the impact of land use on its environmental resources. Biological diversity, including below-ground biodiversity (BGBD), is one of the informative variables used in this evaluation (Sanchez et al., 2005). BGBD is responsible for several functions needed in order to maintain a health environment, such as organic matter decomposition and nutrient cycling (Swift et al., 2004). Land use may change the structure of these communities and, consequently, affect the functioning of the processes they perform (Swift et al., 1998). However, few studies have shown links between land use and bacterial diversity in the tropics compared to other groups of soil organisms (Swift et al., 1998; Bignell et al., 2005) among below-ground organisms. Bacterial communities play a key role in several ecosystem functions and, for this reason, studies focusing on bacterial communities are important.

Molecular methods have been shown to be useful tools to study bacterial communities, especially because they allow the assessment of a diversity that would not be evaluated by cultivation methods due to the fact that the majority of the bacteria cannot be cultivated yet (Hugenholtz et al., 1998). Few studies have been done using these tools to study bacterial communities in Amazonian soils. Some of them compare the effect of land use and forest recovery on the phylogenetic and functional diversity of bacterial communities (Borneman & Triplett, 1997; Yin et al., 2000; Kim et al., 2007). However, only simple comparisons, such as those between pasture and forest, have been made (Borneman & Triplett, 1997). Here we present data for six different land use

systems, showing not only their effect on soil bacterial communities, but also the effect of forest recovery. Recent studies incorporating methods of analysis of ecological data used for studying communities of macroorganisms have shown new features of microbial communities (Green et al., 2004; Horner-Devine et al., 2004; Noguez et al., 2005; Ramette & Tiedje, 2007) and we present data that corroborate and bring additional information to that found in these studies.

Our objective was to study the effect of land use and soil attributes on the diversity of overall bacterial communities in Western Amazonian soils. We used a fingerprinting technique – T-RFLP – in order to assess the structure of microbial communities as well as to correlate changes in their structure to environmental and geographic factors. Clone libraries were also constructed in order to give an insight into the phylogenetic composition of communities.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### **Site description and soil sampling**

The sites of study are placed in the Benjamin Constant municipality, Amazonas State, Brazil, between the geographical coordinates 4°21' and 4°26' south and 69°36' and 70°1' west, along the Solimões River (Figure 3.1). This region is one of the main hotspots of Amazonian biodiversity and the homeland of remaining indigenous peoples, which practice slash-and-burn agriculture. Some pasture sites may also be found in the region as a consequence of government policies implemented during the 1970's. The rate of deforestation in the region is low as a consequence of several factors, mainly the difficulty of access (there are no roads linking the region to other regions in the country and the access to Benjamin Constant is made by the river) and low population density. The climate in the region is classified as Af according to Koppen's classification, with an average annual temperature of 25.7°C and an average precipitation of 2,562 mm. Inceptisols predominate in the studied sites, and some



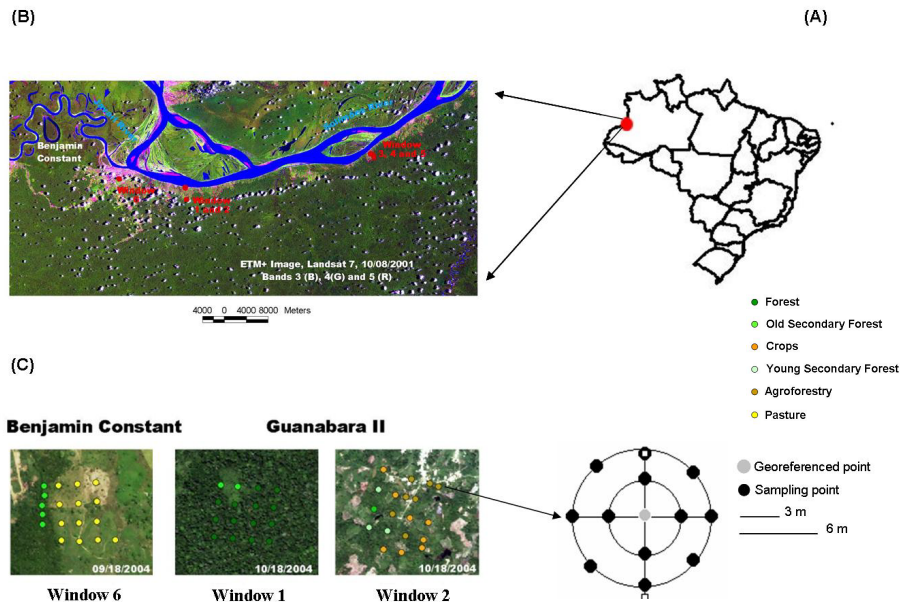


Figure 3.1 Location of Benjamin Constant (BC) Municipality in Brazil (A). Location of windows in BC (B). Distribution of sampling points in windows 1, 2 and 6 (C) (extracted from Fidalgo et al., 2005). One composed soil sample (12 sub-samples) was collected around each sampling point (D).

Gleysols and Alisols may also be found (Coelho et al. 2005a; Coelho et al. 2005b).

Thirty composite soil samples comprising six different land use systems (LUS) were collected. Each composite sample was formed by twelve sub samples, collected at the depth of 0-20 cm, within a circle with the diameter of 6 m (Figure 3.1). The LUS are as follows: Pasture, Crop, Agroforestry, Young Secondary Forest, Old Secondary Forest and Primary Highland Forest. Site classification is presented in the Tables 3.1 and 3.2. Different species were cultivated in the Crop sites, such as cassava, banana, maize, sugar-cane and pineapple. Agroforestry sites were mainly cultivated with peach palm (*Bactris*

*gasipaes*), cupuassu (*Theobroma grandiflorum*), banana, pineapple and coffee, amongst others cultures. The Young Secondary Forest sites comprise secondary forests whose regeneration time was up to 5 years, while the Old Secondary Forest sites have more than 5 years of regeneration time. The samples used in this study were collected in the community Guanabara II, which is placed along the Solimões River, and in Pasture and Secondary Forest Sites close to the city of Benjamin Constant (Figure 3.1) during the rainfall period in March 2004. Collecting tools were sterilized before sampling in order to avoid sample contamination. Samples were sent to the Microbiology laboratory of the Federal University of Lavras and stored at -80°C until use. Chemical and physical soil attributes were analyzed at the Department of Soil Science (Universidade Federal de Lavras, Brazil) according to methodologies compiled by Embrapa (1997). Microbiological analyses were performed in the Center for Microbial Ecology, Michigan State University, USA, as described below.

#### **DNA extraction and 16S rDNA amplification**

Five grams (dry weight) of each soil sample were used for DNA extraction with the Power Max Soil DNA Isolation Kit (Mbio Laboratories Inc.), according to the manufacturer's instructions. DNA samples were quantified by using a Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technology) and stored at -20°C until use. In order to diminish the occurrence of PCR bias and artifacts we combined different procedures presented in the literature: reduced number of cycles, reconditioning PCR, and combination of separate reactions (Thompson et al., 2002; Kanagawa, 2003; Acinas et al., 2005). The 16S rRNA gene was amplified with the primers 63F labeled with 6-carboxyfluorescein (6-FAM/CAGGCCTAACACATGCAAGTC) and 1389R (ACGGGCGGTGTGTACAAG) (Marchesi, 1998; Osborn et al., 2000) in a Robocycler Gradient 96 PCR machine (Stratagene). Thirty micro liter reactions

TABLE 3.1 Identification of sampling sites, represented land use systems (LUS), geographic coordinates and soil chemical attributes<sup>1</sup>.

Points	LUS <sup>2</sup>	Latitude <sup>3</sup>	Longitude <sup>3</sup>	pH	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	K <sup>+</sup>	P	N	Al <sup>+3</sup>	H+Al	SB	t	T	V %	m%
1	YSF	9510626	399330.1	4.4	3.1	2.1	45	3.7	0.2	6.8	26.7	5.3	12.1	32	16.6	56
4	Forest	9510608	399538.1	4.5	6.2	2.3	78	4.6	0.3	4.4	19.1	8.7	13.1	27.8	31.3	34
5	Forest	9510530	399313.8	4.7	4.9	2.7	74	4.9	0.24	4.4	17.1	7.8	12.2	24.9	31.3	36
10	Forest	9510334	399497.3	4.7	3	1	47	5.5	0.2	6.1	19.1	4.1	10.2	23.2	17.7	60
14	Forest	9510544	399226.1	4.4	3.9	2	48	4.9	0.3	6.2	23.9	6	12.2	29.9	20.1	51
16	Forest	9510357	399205.7	4.5	4.3	1.6	53	4.6	0.3	4.2	19.1	6	10.2	25.1	24	41
17A	Agroforestry	9512814	399173.1	4.7	6.5	2	48	3.1	0.3	3.6	17.1	8.6	12.2	25.7	33.5	29
17	Agroforestry	9512775	399316.7	4.8	7.9	1.6	77	6.5	0.2	2.6	13.7	9.7	12.3	23.4	41.5	21
18	Crops	9512584	399264.1	5.2	6.7	1.6	42	2.3	0.3	0.8	5.6	8.4	9.2	14	60	9
19	Crops	9512492	399237.6	6	12.4	2.7	89	3.1	0.26	0	2.6	15.3	15.3	17.9	85.5	0
23	OSF	9512656	398974.5	4.7	5.2	1.9	58	2.8	0.24	4.8	21.4	7.3	12.1	28.7	25.3	40
24	Agroforestry	9512513	399142.8	5	5.2	1.9	34	4.3	0.32	2	8.8	7.2	9.2	16	45	22
25	Agroforestry	9512707	399194	4.8	10.6	3	69	4.6	0.28	2.8	15.3	13.8	16.6	29.1	47.4	17
27	Crops	9512729	399088.6	5	12.9	3	74	3.1	0.28	0.3	6.3	16.1	16.4	22.4	71.9	2
28	Crops	9512442	399025.4	4.9	8	2	106	4	0.24	5.4	21.4	10.3	15.7	31.7	32.4	34
29	YSF	9512538	399047.1	5.2	8.3	2.6	72	2	0.24	1.6	8.8	11.1	12.7	19.9	55.7	13
31	YSF	9512758	398998.7	5	8.5	4.1	58	2.3	0.2	2.5	13.7	12.8	15.3	26.5	48.2	16
32	Crops	9512865	399024.2	4.7	8.6	1.7	122	6.5	0.2	5.4	21.4	10.6	16	32	33.1	34
81	OSF	9514271	386933.9	4.1	1.8	1.1	34	4.9	0.26	7.7	29.9	3	10.7	32.9	9.1	72
82	Pasture	9514275	387029	5.2	2.3	1.7	39	2.8	0.24	3.4	15.3	4.1	7.5	19.4	21.1	45
84	Pasture	9514290	387225.5	5.1	1.8	2.1	67	3.1	0.24	2.3	8.8	4.1	6.4	12.9	31.6	36
88	OSF	9514373	386946.9	4.2	1	0.6	41	3.4	0.26	7.3	23.9	1.7	9	25.6	6.6	81
90	OSF	9514169	386937.4	4.2	1.5	0.4	52	5.2	0.25	7	23.9	2	9	25.9	7.8	78
91	Pasture	9514083	387038.9	5.3	1.5	0.6	30	2.5	0.3	1.8	7	2.2	4	9.2	23.7	45
92	Pasture	9514177	387213.1	4.9	2.8	2.2	48	2.5	0.24	3.9	15.3	5.1	9	20.4	25.1	43
95	Pasture	9514086	387324.6	5.2	1.9	1.7	31	2.8	0.22	2.3	29.9	3.7	6	33.6	11	38

<sup>1</sup> Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup>, Al<sup>+3</sup>, potential acidity (H+Al), sum of bases (SB), effective cation exchange capacity (t) and cation exchange capacity in pH 7 (T), are expressed in cmolc.dm<sup>-3</sup>; P and K are expressed in mg.dm<sup>-3</sup>; N-total (N) is expressed in %. P-K - Mehlich 1 extractor. Ca-Mg-Al - KCl 1N. H+Al - SMP extractor. N - Kjeldhal method. SB = sum of bases. V - base saturation index. m - Al saturation index. <sup>2</sup>Land use systems: YSF, Young Secondary Forest; OSF, Old Secondary Forest.

<sup>3</sup>UTM projection, datum SAD-69, Zone 19S.

TABLE 3.2 Identification of sampling sites, represented land use systems (LUS) and soil chemical (S and micronutrients) and physical attributes<sup>1</sup>.

Points	LUS <sup>2</sup>	S	Zn	Fe	Mn	Cu	B	Prem	OM	Sand (%)	Lime (%)	Clay (%)
1	YSF	10.3	3.9	145	23.6	0.7	0.2	7.7	1.5	11	51	38
4	Forest	14.3	4.6	210	69.7	2	0.3	12.2	1.5	10	49	41
5	Forest	6.2	5.4	158	57.7	1.2	0.4	11.2	1.5	16	40	44
10	Forest	6.2	2	208.8	137.7	1.3	0.2	6.8	1	16	49	35
14	Forest	9.8	9.4	173.5	104.9	1.1	0.3	9.1	1.8	9	45	46
16	Forest	7.1	17.9	191	72.1	1	0.4	13.2	2.2	11	48	41
17A	Agroforestry	10.3	2.9	99.7	85.3	1.9	0.5	10.9	1.6	11	47	42
17	Agroforestry	8.4	4.2	193.5	99.7	1.7	0.7	11.2	2.2	11	47	42
18	Crops	6.2	1.9	10.2	108.1	1.3	0.5	23	1.4	24	47	29
19	Crops	5.4	3.8	92.3	109	1.2	0.6	25.2	2.1	29	41	30
23	OSF	173.4	4.5	178.5	33	2.3	0.3	9.4	1.8	7	48	45
24	Agroforestry	3.7	7.6	104.5	93.3	0.8	0.5	16.4	1.8	30	39	31
25	Agroforestry	3.3	14.6	91.6	11.2	1.6	0.4	15.1	1.9	7	41	52
27	Crops	5.8	5.8	88	112.2	1.3	0.6	16.4	2.2	22	32	46
28	Crops	2.1	3.3	133.5	26.4	1.5	0.3	8.5	1.6	16	34	50
29	YSF	2.9	3.5	184.5	71.5	1.1	0.3	14	1.9	18	48	34
31	YSF	3.3	4.5	74.2	49.4	1.5	0.1	16.9	1.9	11	44	45
32	Crops	4.1	2.9	71.7	56.7	1.6	0.6	9.7	1.6	10	39	51
81	OSF	4.9	3	115.9	51.4	1.3	0	8	1.9	8	47	45
82	Pasture	5.4	21.4	266	18.6	1.8	0	11.2	1.4	26	42	32
84	Pasture	5.8	2.5	300.9	20.9	2.1	0	12.2	1.8	20	51	29
88	OSF	6.2	7.9	94.2	67.4	1.6	0.1	8.5	1.8	7	51	42
90	OSF	4.1	2.5	149.2	70.4	1.5	0.1	9.4	1.4	9	48	43
91	Pasture	4.5	3.1	798	59	1.4	0.1	14.3	1.3	47	10	43
92	Pasture	5.8	10.6	558.5	28.6	2.3	0	7.7	1.6	15	44	41
95	Pasture	5.8	2	675	30.6	2.1	0.4	13.2	1.3	32	41	27

<sup>1</sup> Fe, Mn, Cu, B and S are expressed in mg.dm<sup>-3</sup>; Organic matter (MO) is expressed in OM, dag.dm<sup>-3</sup>, remnant phosphorus (Prem) is expressed in mg.L<sup>-1</sup>; Fe-Zn-Mn-Cu - Mehlich 1 extractor. B - hot water extractor. S- Monocalcic Phosphate in Acetic Acid extractor. MO - organic matter, oxidation with Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 4N + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N.

<sup>2</sup>Land use systems: YSF, Young Secondary Forest; OSF, Old Secondary Forest.

were performed in triplicate for each sample. The reactions contained 0.002U  $\mu\text{L}^{-1}$  Taq DNA polymerase, 1X reaction buffer, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM of each dNTP, 0.2  $\mu\text{M}$  of each primer, 400 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  BSA and 0.6 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  of template. The following conditions were chosen for amplification after optimization: initial denaturation for 2 min. at 94°C; 25 cycles with 1 min. at 94°C for denaturation, 1 min. at 58°C for annealing, and 2 min. at 72°C for extension; and final extension for 10 min. at 94°C. Five micro liter aliquots of each reaction were 10-fold diluted in 50- $\mu\text{L}$  reactions with the same composition and were cycled three times using the same conditions presented above. After analyzing the PCR products by using gel electrophoresis, triplicates were combined and purified with the Qiagen PCR purification kit.

#### **Klenow fragment treatment, restriction digestions and T-RFLP analysis**

Purified PCR products were treated with the Klenow fragment according to Egert and Friederich (2005) (5U of Klenow fragment exonuclease minus per micro liter of DNA, 10  $\mu\text{L}$  of 10X reaction buffer, and 50  $\mu\text{M}$  of each deoxynucleoside triphosphate in a total volume of 100  $\mu\text{L}$  for 1 h, at 20°C in the dark) and purified again with the Qiagen PCR purification kit. Forty nanograms of the purified PCR products were digested with the enzymes MspI and HhaI in 15- $\mu\text{L}$  separate reactions, during 3 hours, at 37°C. Restriction reactions were performed in duplicate for each sample. DNA was precipitated overnight with 1.5  $\mu\text{L}$  of 3 M sodium acetate solution, 0.3  $\mu\text{L}$  of glycogen (20 mg.  $\mu\text{L}^{-1}$ ) and 42  $\mu\text{L}$  of absolute ethanol (Gallagher et al., 2005). After that, it was centrifuged for 35 min. at 14,000 RPM and the supernatant was discharged. The precipitated DNA was washed with 70% ethanol, during 5 minutes, centrifuged again for 35 minutes, and dried by speedy vacuuming. DNA pellets were resuspended in 9.85  $\mu\text{L}$  of deionized formamide and 0.15  $\mu\text{L}$  of ROX size standard 15 minutes before the analysis (Gallagher et al., 2005) in ABI system analyzer. All volume was used for analysis.

### **Clone library construction**

The same PCR conditions used for T-RFLP analysis were used to 16S rRNA gene amplification with the exception that the primer 63F was not labeled with FAM. Triplicates were combined and purified with the Qiagen PCR purification kit. Cloning was performed with the TOPO TA Cloning Kit for Sequencing according to the manufacturer's instructions. Partial sequences were obtained by using the primer 27F for amplification reactions in an ABI 3700 system analyzer, at Macrogen.

### **Data Analysis**

All statistical analyses were performed with the packages Vegan (Oksanen et al., 2007), labdsv (Roberts, 2007), and Biodiversity.R (Kindt & Coe, 2005) for the program R (R Development Core Team, 2007). Besides, sequence data were also analyzed by using DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005) and Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005).

### **T-RFLP**

Firstly, the baseline was determined for each profile by using Perl and the R package, according to the IBEST approach (Abdo et al., 2006). Data were then exported and analyzed by using the T-Align software (Smith et al., 2005). The data obtained for the two used restriction enzymes were combined in one matrix for statistical analysis. From now on, this matrix will be named OTU data matrix.

The OTU data matrix was submitted to Wisconsin double standardization and the rank order of the dissimilarity indexes was evaluated. A dissimilarity matrix was calculated with the Bray-Curtis index and submitted to non-metric multidimensional scaling and cluster analysis using the single linkage algorithm, whose results were superposed to the NMDS ordination in the

form of a minimum spanning tree. Soil chemical and physical variables were regressed against the NMDS scores and fitted to the ordination as vectors.

Geographic distance information was used to perform a principal coordinates of neighbor matrices (PCNM) analysis in order to detect spatial patterns across the whole range of scales perceptible within the data set (Borcard & Legendre, 2002). PCNM, soil attributes and LUS data were used for canonical variation partitioning analysis (Borcard et al., 1992) with the Hellinger-transformed T-RFLP data (Legendre & Gallagher, 2001). Unbiased estimators of the fractions were used (Peres-Neto et al., 2006).

Both Bray Curtis and Euclidean distances were used to calculate the community, edaphic and geographic distance matrices. These matrices were used for distance decay analysis.

### **Clone libraries**

All sequences were uploaded on the RDP website and analyzed by using the RDP tools (release 9.56) (Cole et al., 2007). Sequences were examined for the presence of chimeras with the programs Bellerophon (with the Huber-Hugenholtz correction) (Huber et al., 2004), Mallard (Ashelford et al., 2006), Chimera Check (Maidak et al., 1999) and Pintail (Ashelford et al., 2005) and potential chimeric sequences were excluded from downstream analyses. The selected sequences were used for a search of the most similar sequences with the RDP seqmatch tool (Cole et al., 2007) and these sequences were aligned and downloaded together with the query sequences. Alignments were edited manually and with the program GBlocks using parameters adjusted according to recommendations for DNA sequences (Castresana, 2000) before submission to Phylogenetic analysis. Tests for choosing the most appropriate nucleotide substitution models were performed with PAUP\* version 4.0b10 for Windows (Swofford, 2000) and ModelTest (Posada & Crandall, 1998). Phylogenies were

constructed with the Tamura Nei model plus gamma correction and the neighbor-joining algorithm by the program MEGA 4 (Tamura et al., 2007).

The DOTUR software was used for alpha diversity and richness indices calculations. The distance matrices analyzed by DOTUR were calculated with the edited alignments by using PAUP\* (Swofford, 2000). The Tamura Nei distance with gamma correction and the furthest neighbor sequence assignment method were used. Renyi diversity and evenness profiles (Tóthmérész, 1995; Kindt & Coe, 2005) were also constructed in order to rank communities according to diversity. The analysis of molecular variance (Excoffier et al., 1992) was used in order to check the phylogenetic differentiation of communities.

An applet developed by RDP (Cole et al., 2007) was used to generate matrices with OTUs defined at different levels of dissimilarity. The matrix with OTUs defined at the level of 3% of dissimilarity was chosen for redundancy and clustering analyses. Redundancy analysis was performed with Hellinger-transformed data and clustering with the Bray-Curtis distance and the average linkage algorithm. Indicator values (Dufrene & Legendre, 1997) were calculated for each step of the hierarchical structure of the dendrogram and then used to identify characteristic sequences of groups previously defined by clustering. These sequences were assigned to taxonomic groups by the RDP Classifier tool (Cole et al., 2007). Similar database sequences were identified by the RDP Seqmatch tool (Cole et al., 2007).

### 3 RESULTS

**Ordination of sites based on soil chemical and physical attributes.** We ordered the 26 sampling points used for bacterial community studies based on their soil chemical and physical attributes by principal component analysis. The resulting ordination was compared to the ordination obtained with the 98 points



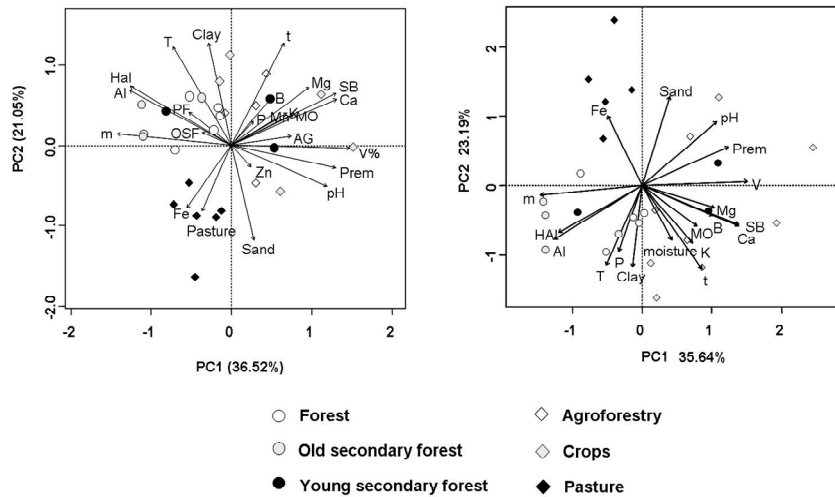


Figure 3.2 Principal component analysis of sampling sites based on their soil chemical and physical characteristics. The graphic on the left presents the ordination based on information from 98 sampling points. Only the points used for microbiological analysis are plotted. The graphic on the right presents the ordination based on information from the 26 points used for microbiological analysis.

collected in the BGBD project<sup>1</sup>. When compared visually, the distribution of points in the two ordinations is similar and a similar relationship between sites and soil attributes is obtained as well (Figure 3.2). In order to statistically check the fitting between the 26 site scores in both ordinations we performed a procrustes analysis, which matches two configurations of points and measures the correlation between them (Cox and Cox, 2001). A highly significant correlation was observed (97.35%,  $P < 0.001$ ), indicating that the 26 points represent relatively well the variation existing in the studied land use systems

<sup>1</sup> Moreira et al., unpublished results.

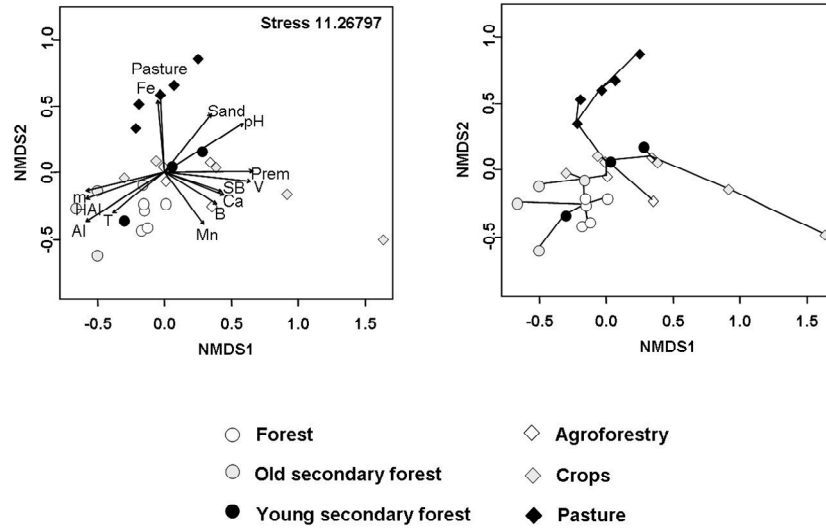


Figure 3.3 Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) analysis of T-RFLP patterns for soil bacterial communities under different land use systems in the Western Amazon. The graphic on the left presents the sites and vectors for environmental variables with a significance of 5% or less. The graphic on the right presents the minimum spanning tree on the NMDS ordination. Each vector points to the direction of increase for a given variable and its length indicates the strength of the correlation between this variable and the ordination scores.

(LUS) and that it was possible to detect most of the gradients of soil attributes existing in the area with these points. Forest and Old Secondary Forest (OSF) sites are related to high potential acidity (H+Al), high  $[Al^{+3}]$ , low pH and low base saturation (V%), while some of the cultivated sites are related to low H+Al, low  $[Al^{+3}]$  high pH and high V%. Young Secondary Forest (YSF) and Agroforestry are related to intermediate values for these variables and Pasture sites are related to high Fe concentrations. The effect of land use on soil attributes was detected by an analysis of similarities (ANOSIM) where the LUS were considered as treatments. This analysis showed a

significant correlation between land use and soil chemical attributes ( $r = 0.4170$ ,  $P < 0.001$ ), with a higher variance among LUS than within them.

**Ordination of sites based on bacterial community structure as determined by T-RFLP analysis.** Nonmetric multidimensional scaling results show that the studied communities differ in structure and that these differences are linked to changes in the soil attributes and LUS (Figure 3.3). A minimum spanning tree was added to the ordination graph in order to help with the interpretation of the results (Pielou, 1984). Several soil attributes were significantly correlated with the NMDS ordination axes and those related to soil acidity ( $[Al^{+3}]$ ,  $Al^{+3}$  saturation,  $H+Al$  and  $pH$ ) and nutrient concentration (base saturation and  $[Ca^{+2}]$ ) were especially significant. Pasture communities were clearly separated from other communities and are related to higher Fe and Cu concentrations. Communities from Forest soils were more similar to communities from OSF soils, even when the sampling sites were several kilometers apart. These LUS are related to high  $[Al^{+3}]$ , high  $H+Al$ , low  $pH$  and low  $V\%$ . In contrast, some cultivated sites are related to low  $[Al^{+3}]$ , low  $H+Al$ , higher  $pH$  and higher  $V\%$ . Agroforestry sites were in the middle of the ordination plot, related to intermediate values of soils attributes. Cultivated and YSF sites do not constitute well-defined clusters, which agree with the high variability in age and vegetation observed in these systems.

The distribution of the sites in the ordination graphic is similar to those found by the ordination with soil attributes. The correlation between the ordinations based on the soil attributes and on the species data was moderately significant (74.15%,  $P < 0.001$ ). ANOSIM showed a lower but significant correlation between LUS and community structure ( $r = 0.32$ ,  $P < 0.001$ ) indicating the effect of land use on the structure of the studied bacterial communities.

**Distance decay analysis.** The influence of edaphic and geographic distances on community similarity was evaluated by distance decay analysis. A significant trend of decay in community similarity with edaphic and geographic distances was observed (Figure 3.4), meaning that communities from soils with higher similarity in their attributes or geographically closer tend to be more similar. The highest correlation was found between community similarity and edaphic distance ( $R^2 = 0.5233$ ). There is also a significant but low correlation between edaphic similarity and geographic distance, meaning that soils geographically closer tend to have more similar attributes ( $R^2 = 0.06814$ ).

**Canonical variation partitioning analysis.** We used canonical variation partitioning analysis to estimate the contribution of soil attributes and geographic distance to differences in the structure of soil bacterial communities. Firstly, we performed a redundancy analysis (RDA) with bacterial data and geographic coordinates in order to check whether there was a linear trend in our data. As no significant trend was observed, all analyses were performed without any control for the trend. Then, we performed a PCNM analysis in order to determine the different geographic scales detected by our sampling design. The sampling design detected 3 geographic scales, represented by 3 PCNMs, which were used as geographic variables in the canonical variation partitioning.

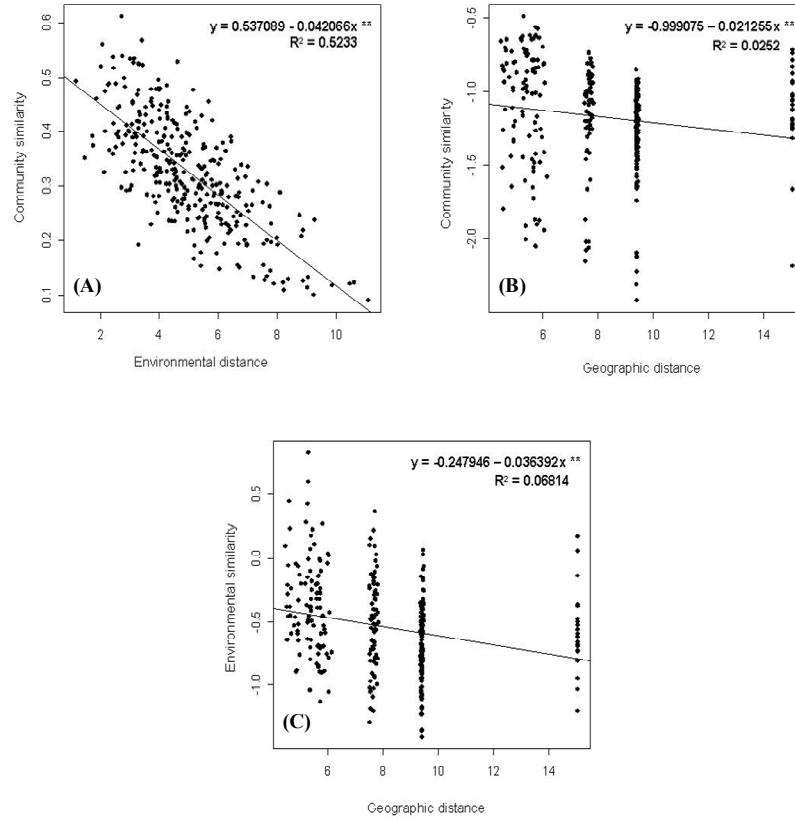


Figure 3.4 Distance decay of bacterial community and environmental similarities. Community similarity between sites was plotted against environmental (A) and geographic (B) distances between the same sites. (C) Environmental similarity between sites was plotted against geographic distance between the same sites. Soil chemical and physical attributes considered for environmental similarity calculations.

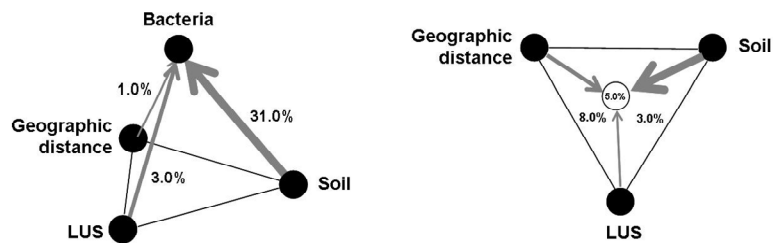


Figure 3.5 Variation partition analysis for bacterial communities of soils under different land use systems in the Western Amazon. The values correspond to adjusted R-squared.

A significant correlation between edaphic factors and community structure is observed and it accounts for about 31% of the observed variation in the data (Figure 3.5). Similarly, interactions between edaphic and other environmental factors present significant correlation with community structure, though they explain a small fraction of the variation. Geographic distance and LUS alone are not statistically significant and account for a very small fraction of the variation. In contrast, the interaction between geographic distance and LUS was significant. More half of the variation (54%) was due to undetected factors.

**Clone libraries.** Based on the T-RFLP analysis, we selected Crops, Pasture, Old Secondary Forest and Forest samples for cloning. We recovered 654 partial sequences of the gene 16S rRNA after disregarding potential chimeras, which are distributed as follows: C19, with 72 sequences; C27, with 83 sequences; P82, with 77 sequences; P84, with 80 sequences; SF81, with 81 sequences; SF90, with 88 sequences; F10, with 87 sequences; and F16, with 86 sequences. Sequences were assigned to the phyla Acidobacteria (38.8%), Actinobacteria (6.1%), Bacteroidetes (8.3%), Chloroflexi (0.3%), Firmicutes (2.4%), Gemmatimonadetes (0.8%) and Proteobacteria (36.2%), including representatives of the classes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  of Proteobacteria. Seven percent of

the sequences remained unclassified regarding phylum affiliation. Differences in the distribution of deeper phylogenetic groups inside these phyla were observed between LUS and most of the sequences matched sequences of uncultured organisms.

Bacteroidetes sequences were mostly found in Crops and Pasture, with a few sequences found in the Forest (Figure 3.6). *Sphingobacterium* and *Pedobacter* sequences were mostly represented in Pasture and C27, and *Flavobacterium* and *Chryseobacterium* sequences were found just in sample C19. In contrast to Bacteroidetes, Actinobacteria and Firmicutes were more abundant in the Forest and OSF. Sequences of Clostridia were found just in those two environments. The majority of the Acidobacteria sequences belongs to group I (Figure 3.7), which was a dominant group in all samples. Group VI was more abundant in Crops, especially in sample C19, from where few Acidobacteria sequences were obtained compared to the other environments.

In Proteobacteria (Figure 3.8), most of the Alphaproteobacteria sequences were assigned to the order Rhizobiales. Inside this class *Rhodoplanes* was found mainly in the Forest, OSF and Pasture and *Brevundimonas* was found in C19 only. In Betaproteobacteria, *Burkholderia* was found mainly in sample F10 and *Massilia* in the Pasture and sample C27 only. In Gammaproteobacteria, several sequences are from Forest and OSF and belong to the family Xanthomonadaceae. *Dyella* was mostly found in F10 and *Lysobacter* was found only in C19. In Deltaproteobacteria, more than half of the sequences were found in the Pasture.

OTUs were defined at the level of 3% of dissimilarity and sequences were submitted to clustering and redundancy (RDA) analyses. We chose this cut-off since it is considered to have a good correlation with DNA-hybridization results for species definition (Rosselló-Mora & Amann, 2001) and because different







FIGURE 3.7 Evolutionary relationships among Acidobacteria sequences from soils under different land use systems in the Western Amazon as estimated by neighbor joining with the TrN model and gamma correction ( $\alpha = 0.350268$ ). Squares on the nodes indicate the main groups as follows: gp1, black; gp3, white; gp5, light grey; gp6, dark grey.



FIGURE 3.8 Evolutionary relationships among Proteobacteria sequences from soils under different land use systems in the Western Amazon as estimated by neighbor joining with the TrN model and gamma correction ( $\alpha = 0.361512$ ). Labels indicate the origin of the sequences. Squares on the nodes indicate the main groups as follows: Alphaproteobacteria, black; Betaproteobacteria, dark grey; Deltaproteobacteria, light grey; Gammaproteobacteria, white.

cut-off values resulted in similar groupings of the samples by clustering (Annex, Figure A1). Clone libraries clustered according to differences in pH and  $[Al^{+3}]$  (Figure 2.6) and the samples were distributed into three large groups, which could be divided into low pH and high  $[Al^{+3}]$  (Forest and OSF), intermediate pH and  $[Al^{+3}]$  (Pasture and C27) and high pH (C19). The same grouping was observed by RDA constrained with variables linked to pH and nutrient concentration and the analysis shows that differences in community structure are significantly related to changes in these soil attributes as observed for T-RFLP analysis (annex, Figure A2).

In order to identify sequences of organisms that are characteristic to sites and groups of sites, we calculated the indicator value index (Dufrêne & Legendre, 1997) for each level of the topology obtained by clustering with sequence data (Figure 3.9). Sequences with significant indicator values were found among the phyla Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes and the classes  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  of Proteobacteria (Figure 3.10). They matched sequences belonging to several genera (annex, Table A1). Some sequences were assigned to high hierarchic levels, such as F10-31, F10-81, F10-85 and F16-2, which were found in all samples, except in sample C19, and matched sequences belonging to *Arthrobacter*, *Bradyrhizobium*, Acidobacteria (gp III) and an uncultured Gammaproteobacteria, respectively (Figure 2.9 and Table A1). These are sequences of organisms with a larger niche breadth, as indicated by the decrease in their indicator value as the sites are split among different site groups (Annex, Figure A3). Other sequences were assigned to intermediate hierarchic levels representing specific groups of sites, such as sequences F10-27 and F10-57, which were assigned to sites with low pH and matched sequences of uncultured gp I and uncultured Rhodoplanes, and sequences P82-16, P82-57, P82-70 and P84-30, which were assigned to Pasture and matched sequences of uncultured bacteria, including Sphingomonadaceae, Sphingobacteriales and Acidobacteria

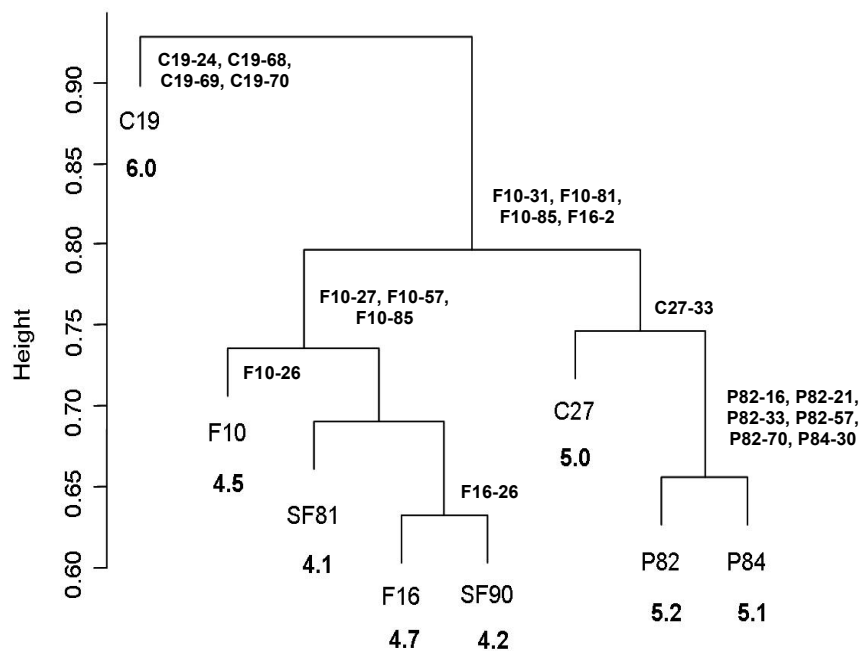


Figure 3.9 Dendrogram based on the structure of soil bacterial communities considering the cut-off of 97% of similarity for OTU definition. The Bray-Curtis distance and the average linkage algorithm were used. The numbers in boldface indicate the pH for each soil sample. Codes placed at the nodes refer to sequences representative of each specific group. For example, F10-27 is representative of a group of sequences from Forest and Secondary Forest, which are characteristic of these sites. C, crops; F, forest; P, pasture; SF, old secondary forest. It can be observed that the communities cluster according to soil pH.

(gp I). Some other sequences were assigned to specific sites, such as F10-26, found at sample F10, and sequences assigned to site C27.

Finally, we used the analysis of molecular variance (AMOVA) in order to test the significance of genetic differentiation within communities and between communities and groups of communities as defined by cluster analysis. The AMOVA shows that 4.98%, 2.97% and 92.05% of the genetic variation is

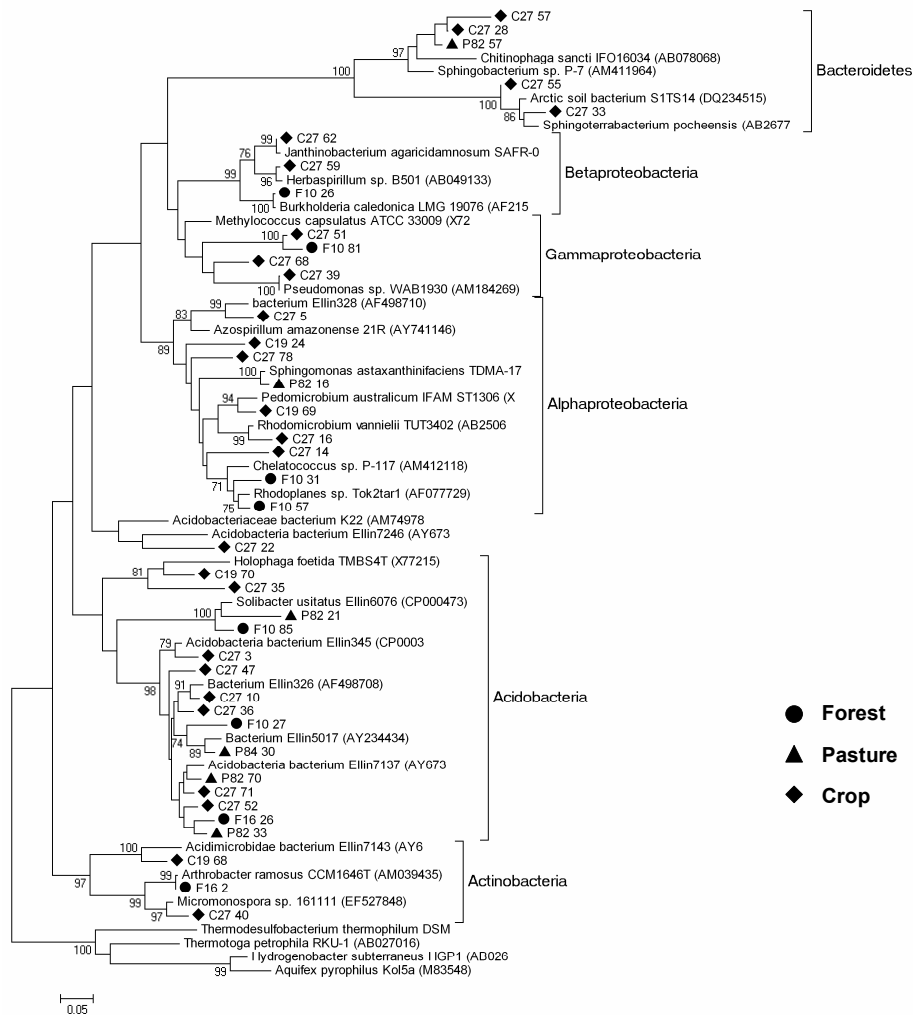


Figure 3.10 Rooted bootstrap consensus phylogenetic tree for indicator sequences of bacterial communities of soils under different land use systems in the Western Amazon as estimated by neighbor joining with the TrN model and gamma correction ( $\alpha = 0.354776$ ). Sequences of *Thermodesulfobacterium thermophilum*, *Thermotoga petrophila*, *Hydrogenobacter subterraneus* and *Aquiflex pyrophilus* were used as outgroups. Bootstrap values equal to and higher than 70% are presented on the nodes. Black symbols indicate the origin of the sequences.

TABLE 3.3 Pairwise fixation indices for soil bacterial communities under different land use systems in the Western Amazon. All indices are significant, except those in italics.

	F10	F16	SF81	SF90	P82	P84	C19	C27
F10								
F16	0.028							
SF81	0.073	<i>0.008</i>						
SF90	0.097	0.026	<i>0.011</i>					
P82	0.084	0.021	0.017	0.018				
P84	0.078	0.014	0.027	0.051	0.018			
C19	0.158	0.121	0.166	0.211	0.160	0.086		
C27	0.063	0.020	0.046	0.067	0.033	<i>0.003</i>	0.070	

observed among groups, among populations within groups and within the studied communities, respectively, meaning that most of the measured genetic diversity is within the communities rather than among them. Low and significant indicator index ( $F_{st}$ ) values were found for pairwise comparisons between communities, except between secondary forest samples and between samples P84 and C27, which presented a non significant  $F_{st}$  (Table 3.3). Significance means that communities differ in genetic structure, though differences are small, as shown by the low  $F_{st}$  values.

**Richness and diversity measures.** We found 50-85 peaks with the HhaI enzyme and 56-101 peaks with the MspI enzyme in the T-RFLP profiles of the studied bacterial communities. Accumulation curves of all clone libraries built with the number of OTUs and the Chao1 richness estimator do not flatten off (Annex, Figure A4), showing that more sequences would be necessary in order to make reliable richness estimates.

Renyi diversity and evenness profiles were built with the environmental sequences in order to rank communities according to diversity. Ranking based on these profiles are preferred to ranking based on single indices, since rank order based on a single diversity index may change when a different index is

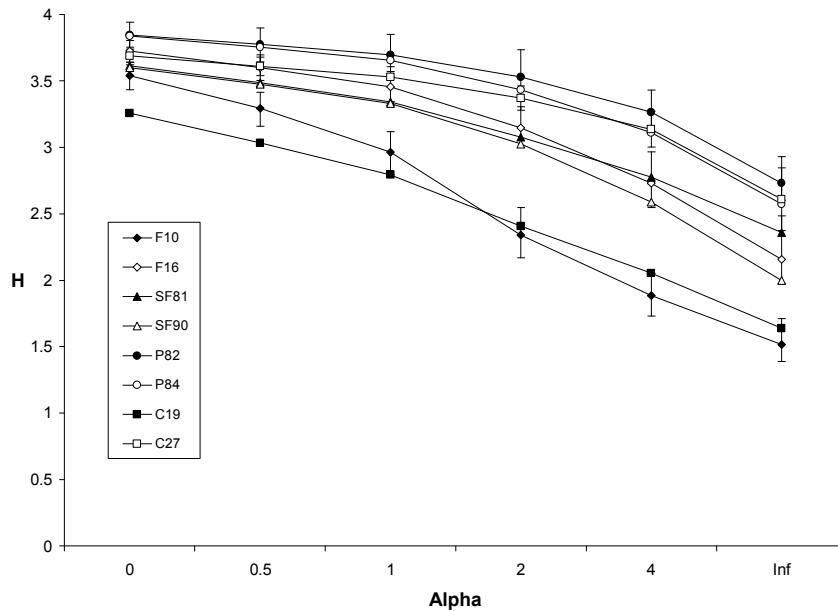


Figure 3.11 Renyi diversity profiles for soil bacterial communities considering the cut-off of 97% of similarity for OUT definition. The values 0, 1, 2 and inf in the x axis refer to the species richness and Shannon, Simpson and Berger-Parker diversity indices, respectively. Communities whose curves intersect cannot be ordered according to diversity. Communities were rarefied (1000 permutations) and the confidence intervals are presented as the 2.5% and 97.5% percentile values obtained during permutations.

used (Kindt et al., 2006). When curves for two communities intersect, this means that they cannot be ranked according to diversity or evenness.

We divided the studied communities into three main groups based on their Renyi diversity profiles (Figure 3.11). The first group is constituted by communities of Pasture and C27 and presented the highest diversity, with P82 as the most diverse community, followed by P84 and C27, which cannot be ranked as indicated by the intersection of their profiles. Communities in this group are the same communities that included in a group related to intermediate pH in the clustering analysis. P82 and C27 were also the most even communities, followed

by P84, whose profile intersects with the profile of SF81, meaning that these two communities cannot be ranked regarding evenness. The second group, presenting intermediate diversity, is constituted by communities of Secondary Forest and F16. F16 was more diverse than community SF90. The diversity profile of F16 intersected the profile of C27 and, for this reason, these communities cannot be ranked regarding to diversity. Communities in the second group cannot be ranked regarding evenness because their profiles intersect. The third group is constituted by communities F10 and C19, with the lowest diversity. C19 cannot be differentiated from communities in the second group regarding evenness because their profiles intersect. F10 is the least even of all communities.

#### **4 DISCUSSION**

Our results show that differences in the composition and diversity of bacterial communities in the Western Amazon was affected by land use and are related to changes in several soil attributes, especially those linked to soil acidity and nutrient concentration, which were shown to be highly significant. Several sequences could be identified as indicative of specific environmental conditions. Soil attributes were also found as determinants of plant species distributions in Amazonia and other tropical forests (John et al., 2007; Tuomisto et al., 1995; Tuomisto et al., 2003), including attributes found as significant in our study, such as Ca and Al concentrations. Also, previous studies performed in the same sites that we studied shows that the same soil factors affect the density of Leguminosae-nodulating bacterial communities (Lima, 2007).

Similarity between communities decayed with edaphic distance (Figure 3.4), that is, samples with similar soil attributes presented more similar composition, which shows that the distribution of bacteria in the studied area is structured according to edaphic factors. This linkage is also shown by the high correlation between ordinations based on the soil attributes and on community



structure. Similarity between communities also decayed with geographic distance, but the geographic distance was not significant by variation partitioning analysis when the effect of soil attributes and LUS were not considered. LUS itself was also not significant, but its interaction with geographic distance was. These results can be explained by the non random distribution of LUS in the studied areas: Forest sites are restricted to window 1; crops, Agroforestry and Young Secondary Forest sites are restricted to window 2; and Pasture and most of the Old Secondary Forest sites are restricted to window 6 (Figure 3.1) It is reasonable to state that closer points tend to be more similar in community structure since they frequently belong to the same LUS. Thus, the significant interaction between LUS and geographic distance can be explained as a result of the geographic distribution of LUS.

Undetermined factors account for more than half of the variation in the data. Similar results were observed for *Burkholderia* genotypes and the large amount of unexplained variation in the data was considered to be the result from noise introduced by unmeasured environmental and spatial variability, sampling effects and neutral ecological drift (Ramette & Tiedje, 2007). Besides, the unaccounted effect of ecological interactions between organisms and historical events may be contributing to the unexplained variation (Martiny et al., 2006). In our case, the rhizosphere environment can also be an important unaccounted factor contributing to differences in community structure, since different species of plants present in the studied LUS can be influencing community structure as found elsewhere (Ramette & Tiedje, 2007).

Although a direct effect of LUS on bacterial community structure was not detected, LUS has an indirect effect on it by means of changes in the soil attributes. The linkage between changes in the soil attributes and land use is shown by ordination (Figure 3.2) and ANOSIM. Soil chemical attributes in the studied areas change due to slash-and-burn agriculture, as a consequence of the

deposition of the ash of the burned vegetation and increased rates of organic matter decomposition (Palm et al., 1996; Smyth, 1996), and our results show that the composition of communities changes accordingly. As time goes by, nutrients are depleted and these attributes tend to return to their previous state (Juo & Manu, 1996; Palm et al., 1996). Although the LUS harbors different bacterial communities, as indicated by the significant fixation indexes of AMOVA, the higher similarity between communities from OSF and Primary Forest soils may indicate that the previous community structure is being recovered during the successional process. This can have practical consequences, since similar communities may indicate the recovery of functions originally present in the primary forest and that changes in bacterial community structure due to slash-and-burn agriculture are reversible under the conditions observed at the sites that we studied. These sites are surrounded for large areas covered with forest (Figure 3.1), which can serve as a source of genetic material for colonization of previously deforested areas. Another important remark to be made is that bacterial communities responded rapidly to changes in soil attributes due to cultivation and forest recovery, as shown by the significant difference in structure between communities from Forest and cultivated soils as well as communities from cultivated soils and Secondary Forest. Cultivated areas are relatively young (Fidalgo et al., 2005), one year-old since the beginning of cultivation. Nevertheless, we observe a significant difference in the structure of their soil communities. In contrast to this finding, it was formerly found that bacterial communities did not differ between sites cultivated with corn/soybean/wheat and a 7-years-old successional site in Michigan, USA (Buckley & Schmidt, 2003). However, there are clear differences between environmental conditions, such as temperature, precipitation, soil types and vegetation, between these two areas and between the cultivation systems studied.

Michigan cultivation sites have a long history of cultivation (>50 years) whereas Brazilian crop sites are young.

Clustering of libraries according to pH and  $[Al^{+3}]$  indicates that these are important factors determining the structure of these communities. However, we did not observe a clear pattern of variation in diversity related to pH and  $[Al^{+3}]$  for our samples, though some results indicate a possible effect of these variables in the differentiation of communities regarding diversity, as discussed further. Our data suggest that LUS and soil attributes, including pH, clearly influenced the structure of communities rather than diversity as measured by the indices known in the literature. Several communities could not be ranked according to diversity as shown by the intersection of the Renyi profiles (Figure 3.4). Pasture bacterial communities were the most diverse and C19 and F10 were the least diverse. It seems that Pasture does not deplete bacterial diversity, rather keeps or even stimulate it. This is a finding different from what would be expected, that is, higher diversity in the Forest. Previous studies in areas of slash-and-burn agriculture in Indonesia found that *Imperata* grasslands were not depleted from a soil biological perspective when compared to Forest and other LUS (Hairiah et al., 2005). Previous studies also show that higher bacterial diversity can be found in cultivated sites than in forest sites (Silveira et al., 2006). However, it is necessary to stress that measurements of other environmental variables besides bacterial diversity are needed in order to make inference about the sustainability of Pasture systems. Besides, a sample of Crops was as diverse as the Pasture. Interestingly, these samples presented a similar structure and close pH values as indicated in Figure 6, which may indicate that high diversity is related to intermediate pH.

It has long been known that soil factors, especially pH, have a great influence on bacterial communities and, recently, pH was presented as a major determinant of soil bacterial community richness, diversity and composition in

local and continental scales (Fierer & Jackson, 2006). The pH is a master variable in the soil environment since it is responsible for driving changes in several other soil attributes, such as the availability of  $\text{Al}^{+3}$  and nutrients in the soil solution (McBride, 1994; Marschner, 1995). Differences in soil pH can be related to mineralogy and sources of acidity, such as  $\text{Al}^{+3}$  and organic matter (McBride, 1994; Marschner, 1995). It is reasonable to affirm that there is also an indirect effect of pH on soil bacteria, which is related to the availability of nutrients and toxic elements, especially  $\text{Al}^{+3}$ , besides its direct effect. In fact, this is observed in our studied sites, where higher pH values are correlated to low  $\text{Al}^{+3}$  and higher  $\text{Ca}^{+2}$  concentrations in the soil solution. The soils in the studied area are rich in  $\text{Al}^{+3}$  due to the presence of minerals with Al inter layers as described elsewhere (Marques et al., 2002; Coelho et al. 2005a; Coelho et al., 2005b). Although some studies (Gamma & Kiehl, 1999; Marques et al., 2002) suggest that at least part of this Al may not be biologically available in the soil solution, essays performed in our lab with common beans indicate that it is available in toxic concentrations, since plants cultivated in soil without liming had their growth affected<sup>2</sup>. Al is considered as being toxic to plants and microorganisms (Flis et al., 1993; Marschner, 1995; Wood, 1995; Illmer et al., 1995) and may be a limiting factor for some bacterial species in the studied soils.

Differences in community composition among the land use systems were shown by 16S rRNA gene sequencing analysis and we identified sequences characteristic to groups of libraries formed by clustering analysis. *Arthrobacter* and *Bradyrhizobium* were present in all LUS. *Arthrobacter* is commonly found in soils from different parts of the world and, sometimes, it is the most numerous group recorded in aerobic plate counts (Elkan & Bunn, 1992). Similarly, an *Arthrobacter* strain was found in lysimeter soils differing in plant biomass, plant

---

<sup>2</sup> Unpublished data.

diversity and water content (Zul et al. 2007), which did not happen for another group closely related to *Massilia*, indicating the adaptation ability of strains of this genus to different environmental conditions. Representatives of this genus are considered to be able to use a wide range of organic substrates as sole or principal sources of carbon and energy, as well as able to degrade xenobiotics, such as herbicides and polycarbonates (Jones & Keddie, 1992; Crocker et al., 2000; Goel et al., 2008; Kolic et al., 2007). Besides, *Arthrobacter* strains have extreme resistance to drying and starvation (Jones & Keddie, 1992). Some *Arthrobacters* were reported as able to dissolve Al silicates and most were considered to be capable to fix N<sub>2</sub> (Jones & Keddie, 1992). A recent genomic study reported genes encoding for a large number of proteins involved in stress responses due to starvation, desiccation, oxygen radicals and toxic chemicals in the genome of *Arthrobacter aureescens* TC1 (Mongodin et al., 2006). The metabolic versatility of this strain was attributed in part to the presence of duplicated catabolic genes and its ability to funnel plasmid-derived intermediates into chromosomally encoded pathways (Mongodin et al., 2006). *Arthrobacter* strains isolated from sewage and soil were reported as able to perform heterotrophic nitrification (Vestraete & Alexander, 1972a; Vestraete & Alexander, 1972b; Wehrfritz et al., 1997; Brierley & Wood, 2001), which would be an important feature if present in soil strains from our studied areas. Heterotrophic nitrification, which is considered as performed by fungi and heterotrophic bacteria (Pedersen et al., 1999; Brierley & Wood, 2001), may be an important process in acid soils, since the growth of autotrophic nitrifiers is favored by neutral to slightly alkaline pH. In a previous study focusing in ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria, sequences belonging to genera related to *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* and *Nitrosolobus* were not found in Forest soils of the Amazon and only one sequence related to *Nitrobacter*, though the highest nitrification rates were found in these soils among the soils studied (Cenciani,

2007). Therefore organisms other than those traditionally cited in the literature may perform those processes. *Arthobacter* is likely to perform nitrification for previous reports cite representatives of these groups as able to perform heterotrophic nitrification. This feature may also be noticed in other bacteria found in our libraries, such as *Pseudomonas* and *Flavobacterium* sp. *Flavobacterium* sp. was especially abundant in cultivated soils (Figure 3.6).

*Bradyrhizobium* is mainly known for its ability to fix N<sub>2</sub> in symbiosis with legumes. The Leguminosae is the richest botanic family in Amazon and the fifth in density (Ducke, 1949; Black et al., 1950; Prance et al., 1976 apud Moreira et al., 1992). Indeed, nodulated legumes can be found in the studied areas. Previous reports indicate that most of the rhizobial symbionts of woody legumes in Brazil belong to the *Bradyrhizobium* genus (Moreira et al., 1993). Besides, *Bradyrhizobium*, several sequences belonging to *Burkholderia*, which is another genus able to fix N<sub>2</sub>, were found in one of the Forest samples. Representatives of these genera which are able to nodulate common beans and siratro were found in previous studies in the area<sup>3</sup>.

Proportionally, most of the sequences found in the areas belong to the phyla Acidobacteria and Proteobacteria, and sequences belonging to representatives of these groups were characteristic of some sites groups. Sequences of Acidobacteria gp I and gp III are characteristic of Forest and Pasture sites, and sequences of gp VI are characteristic of cultivated sites. Acidobacteria is widespread in the environment, as shown by Barns et al. (1999). These authors detected sequences belonging to this phylum in samples from different environments, such as soil from forest (Amazon), pasture (Amazon), semi-arid environments (Arizona and Utah) and cultivated areas, volcanic material, marsh and river sediments, and mats from hot springs (64-

---

<sup>3</sup> Barberi et al. and Lima et al., unpublished data.

71°C) with neutral to alkaline pH. Acidobacteria was also found in sewage sludge (Layton et al., 2000) and in a waste water treatment bioreactor (LaPara et al., 2000). According to Barns et al. (1999) members of the Y and O subgroups (group III) were not found in acid soils and sediments (pH < 6) and neutrophily was considered as a possible feature of these groups. However, we found sequences belonging to group III in soils with a pH range of 4.1 to 5.2, which can be considered as acid to moderate acid by agricultural standards.

Acidobacteria can be divided into six groups which differ up to 22% in their 16S rRNA genes (Barns et al., 1999) and high genetic and metabolic diversity is expected in this phylum due to its widespread distribution and phylogenetic diversity. Although very common in library surveys, few representatives of Acidobacteria have been isolated (Janssen et al., 2002; Sait et al., 2002). Considering its ubiquity and frequency in these surveys, high genetic and metabolic diversities are expected in this phylum. For this reason, Acidobacteria may play an important role in processes occurring in the soil. Quaiser et al. (2003) sequenced genomic fragments of members of the group Acidobacteria from DNA extracted from soil and found a ribosomal RNA operon with structure similar to those of known Bacteria as well as a coding density as high as that observed in other bacterial genomes (83-90%). The G+C content was consistent with the different phylogenetic placement of the genomic fragments and the coherence of Acidobacteria was confirmed through the phylogenetic analyses with deduced protein sequences. Most of the genes identified were orthologues of general metabolic and house-keeping genes, such as genes linked to cell invasion in pathogenic or symbiotic relationships, to the degradation of PHB and to the synthesis of lincomycin. The authors found evidence of horizontal gene transfer among members of the order Rhizobiales and Acidobacteria, since several regions of the studied fragments had genes and gene dispositions which are similar to those found in the genomes of

representatives of this order. Interestingly, in our survey, sequences belonging to Rhizobiales were the most frequent among the Alphaproteobacteria sequences.

Based on our findings, we can conclude that highly diverse bacterial communities are present in the studied LUS and that differences in diversity and structure are related to land use through its effects on the soil attributes. Although, half of the variance in the communities was due to undetermined factors, differences in the soil attributes, especially those attributes related to soil acidity and nutrient concentration, determined differences in the structure of bacterial communities. Land use, presumably through its influence on soil attributes, was a significant factor determining the structure of bacterial communities in the studied soils.

## 5 ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the Global Environmental Facility/United Nations Environment Programme (GEF/UNEP project CSM-BGBD/GF2715-02 with the global coordination of CIAT/TSBF) and the Center for Microbial Ecology (Michigan State University) for the financial support, the Capes foundation for the “sandwich” fellowship provided to Ederson da C. Jesus and the CNPq for F. M. S. Moreira research fellowship.

## 6 REFERENCES

ABDO, Z.; SCHÜETTE, U. M. E; BENT, S. J.; WILLIAMS, C. J; FORNEY, L. J.; JOYCE, P. Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. **Environmental Microbiology**, v.8, n.5, p.929-938, 2006.



ACINAS, S. G.; SARMA-RUPAVTARM, R.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M. F. PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.12, p.8966-8969, 2005.

ASHELFORD, K. E.; CHUZHANOVA, N. A.; FRY, J. C.; JONES, A. J.; WEIGHTMAN, A. J. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.12, p.7724-7736, 2005.

ASHELFORD, K. E.; CHUZHANOVA, N. A.; FRY, J. C.; JONES, A. J.; WEIGHTMAN, A. J. New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.9, p.5734-5741, 2006.

BARNS, S. M.; TAKALA, S. L.; KUSKE, C. R. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.4, p.1731-1737, 1999.

BIGNELL, D. E.; TONDOH, J.; DIBOG, L.; HUANG, S. P.; MOREIRA, F.; NWAGA, D.; PASHANASI, B.; PEREIRA, E. G.; SUSILO, F.-X.; SWIFT, M. J. Below -Ground biodiversity assessment. In: PALM, C. A.; VOSTI, S. A.; SANCHEZ, P. A.; ERICKSEN, P. J. **Slash-and-burn agriculture: the search for alternatives**. New York: Columbia University, 2005. p.119-142.

BLACK, G. A.; DOBZHANSKY, T. H.; PAVAN, C. Some attempts to estimate species diversity and population density of trees in amazonian forest. **Botanical Gazette**, Chicago, v.3, n.4, p.413-425, 1950.

BORCARD, D.; LEGENDRE, P. All-scale analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbor matrices. **Ecological Modelling**, v.153, p.51-68, 2002.

BORCARD, D.; LEGENDRE, P.; DRAPEAU, P. Partialling out the spatial component of ecological variation. **Ecology**, v.73, n.3, p.1045-1055, 1992.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.7, p.2647-2653, 1997.

BRIERLEY, E. D. R.; WOOD, M. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterisation of a nitrifying bacterium. **Soil Biology & Biochemistry**, v.33, p.1403-1409, 2001.

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

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**, v.17, n.4, p.540-552, 2000.

CENCIANI, K. **Diversidade bacteriana em solos da Amazônia**: variabilidade dos gêneros associados ao processo de nitrificação. 2007. 103p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

COELHO, M. R.; FIDALGO, E. C. C.; ARAÚJO, F. de O.; SANTOS, H. G. dos; SANTOS, M. de L. M.; PÉREZ, D. V.; MOREIRA, F. M. S. **Solos das áreas-piloto do Projeto BiosBrasil (Conservation and Sustainable Management of Below Ground Biodiversity: Phase I), Município de Benjamin Constant, Estado do Amazonas**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005a. (Embrapa Solos. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 67). Disponível em: <[www.biosbrasil.ufla.br](http://www.biosbrasil.ufla.br)>. Acesso em: 10 nov. 2006.

COELHO, M. R.; FIDALGO, E. C. C.; ARAÚJO, F. de O.; SANTOS, H. G. dos; SANTOS, M. de L. M.; PÉREZ, D. V.; MOREIRA, F. M. S. **Levantamento pedológico de uma área-piloto relacionada ao projeto BiosBrasil (Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity: Phase I), Município de Benjamin Constant (AM): Janela 6**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005b. (Embrapa Solos. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 68). Disponível em: <[www.biosbrasil.ufla.br](http://www.biosbrasil.ufla.br)>. Acesso em: 10 nov. 2006.

COLE, J. R.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S.; MVGARRELL, D. M.; BANDELA, A. M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, v.35, D169-D172, 2007.

COX, T. F.; COX, M. A. A. **Multidimensional scaling**. 2<sup>nd</sup>ed. Chapman Hall: CRC, 2001. (Monographs on Statistics and Applied Probability, 88).

CROCKER, F. H.; FREDRICKSON, J. K.; WHITE, D. C.; RINGELER, D. B.; BALKWILL, D. L. Phylogenetic and physiological diversity of *Arthrobacter* strains isolated from unconsolidated subsurface sediments. **Microbiology**, v.146, p.1295-1310, 2000.

DUCKE, A. **As leguminosas da Amazônia Brasileira**: notas sobre a flora neotropica. II. Belém: Instituto Agrônômico do Norte, 1949. (Instituto Agrônômico do Norte. Boletim Técnico, 18).

DUFRÊNE, M.; LEGENDRE, P. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. **Ecological Monographs**, v.67, n.3, p.345-366, 1997.

EGERT, M.; FRIEDRICH, M. W. Post-amplification Klenow fragment treatment alleviates PCR bias caused by partially single-stranded amplicons. **Journal of Microbiological Methods**, v.61, p.69-75, 2005.

ELKAN, G. H.; BUNN, C. R. The rhizobia. In: BALOWS, A.; TRÜPPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K-H. (Ed.). **The prokaryotes**. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1992. p.2197-2213.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análises de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro, 1997. 212p.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p. 47-50, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p.479-491, 1992.

FIDALGO, E. C. C.; COELHO, M. R.; ARAÚJO, F. de O.; MOREIRA, F. M. S.; SANTOS, H. G. dos, SANTOS, M. de L. M.; HUISING J. **Levantamento do uso e cobertura da terra de seis áreas amostrais relacionadas ao projeto BiosBrasil (Conservation and Sustainable Management of Below-Groud Biodiversity: Phase I), Município de Benjamin Constant (AM)**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005. (Embrapa Solos. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento). Disponível em: <www.biosbrasil.ufla.br>. Acesso em: 10 nov. 2006.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.3, p.626-631, 2006.

FLIS, S. E.; GLENN, A. R.; DILWORTH, M. J. The interaction between Aluminum and root nodule bacteria. **Soil Biology & Biochemistry**, v.25, n.4, p.403-417, 1993.

GALLAGHER, E.; MCGUINNESS, L.; PHELPS, C.; YOUNG, L. Y.; KERKHOF, L. J. <sup>13</sup>C-carrier DNA shortens the incubation time needed to detect benzoate-utilizing denitrifying bacteria by stable-isotope probing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.9, p.5192-5196, 2005.

GAMMA, J. R. N. F.; KIEHL, J. C. Aluminum influence on plants grown in a Brazilian Red-Yellow Podzolic Soil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, n.2, p.475-582, 1999.

GOEL, R.; ZAIDI, M. G. H.; SONI, R.; LATA, K.; SHOUCHE, Y. S. Implication of *Arthorbacter* and *Enterobacter* species for polycarbonate degradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.61, p.167-172, 2008.

GREEN, J. L.; HOLMES, A. J.; WESTOBY, M.; OLIVER, I.; BRISCOE, D.; DANGERFIELD, M.; GILLINGS, M.; BEATTIE, A. J. Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. **Nature**, v.432, p.747-750, 2004.

HAIRIAH, K.; NAN NOORDWIJK, M.; WEISE, S. Sustainability of tropical land use systems after forest conversion. In: PALM, C. A.; VOSTI, S. A.; SANCHEZ, P. A.; ERICKSEN, P. J. **Slash-and-burn agriculture: the search for alternatives**. New York: Columbia University, 2005. p. 143-169.

HORNER-DEVINE, M. C.; LAGE, M.; HUGHES, J. B.; BOHANNAN, B. J. M. A taxa-area relationship for bacteria. **Nature**, v.432, p.750-753, 2004.

HUBER, T.; FAULKNER, G.; HUGENHOLTZ, P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. **Bioinformatics**, v.20, n.14, p.2317-2319, 2004.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.4765-4774, 1998.

ILLMER, P.; MARSCHALL, K.; SCHINNER, F. Influence of available aluminum on soil micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p.393-397, 1995.

JANSSEN, P. H.; YATES, P. S.; GRINTON, B. E.; TAYLOR, P. M.; SAIT, M. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.8, n.5, p.2391-2396, 2002.

JOHN, R.; DALLING, J. W.; HARMS, K. E.; YAVITT, J. B.; STALLARD, R. F.; MIRABELLO, M.; HUBBELL, S. P.; VALENCIA, R.; NAVARRETE, H.; VALLEJO, M.; FOSTER, R. B. Soil nutrients influence spatial distribution of tropical tree species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.1043, p.864-869, 2007.

JONES, D.; KEDDIE, R. M. The genus *Arthrobacter*. In: BALOWS, A.; TRÜPPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K-H. (Ed.). **The prokaryotes**. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1992. p.1283-1299.

JUO, A. S.; MANU, R. A. Chemical dynamics in slash-and-burn agriculture. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.58, p.49-60, 1996.

KANAGAWA, T. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.96, n.4, p.317-323, 2003.

KIM, J-S., SPAROVEK, G.; LONGO, R. M.; MELO, W. J. de; CROWLEY, D. Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. **Soil Biology Biochemistry**, v.39, p.684-690, 2007.

KINDT, R.; COE, R. **Tree diversity analysis**. a manual and software for common statistical methods and biodiversity studies. Nairobi: World Agroforestry Centre ICRAF, 2005. 196p.

KOLIC, N. U.; HRSAK, D.; KOLAR, A. B.; PETRIC, I.; STIPICEVIC, S.; SOULAS, G.; MARTIN-LAURENT, F. Combined metabolic activity within an atrazine-mineralizing community enriched from agrochemical factory soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.60, p.299-307, 2007.

LAPARA, T.M.; NAKATSU, C.H.; PANTEA, L.; ALLEMAN, J.E. Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.9, p. 3951–3959, 2000.

LAYTON, A. C.; KARANTH, P. N.; LAJOIE, C. A.; MEYERS, A. J.; GREGORY, I. R.; STAPLETON, R. D.; TAYLOR, D. E.; SAYLER, G. S. Quantification of *Hyphomicrobium* populations in activated sludge from an industrial wastewater treatment system as determined by 16S rRNA analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.3, p.1167–1174, 2000.

LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E. D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. **Oecologia**, v.129, p.271-280, 2001.

LIMA, A. S. **Densidade, eficiência e diversidade de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> que nodulam o siratro *Macropitium atropurpureum* de solos sob diferentes usos na Amazônia Ocidental**. 2007. 167p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MAIDAK, B. L.; COLE, J. R.; PARKER JR, C. T.; GARRITY, G. M.; LARSEN, N.; LI, B.; LILVURN, T. G.; MCCAUGHEY, M. J.; OLSEN, G. J.; OVERBEEK, R.; PRAMAKIK, S.; SCHMIDT, T. M.; TIEDJE, J. M.; WOESE, C. R. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Research**, v.27, n.1, p.171-173, 1999.

MARCHESI, J. R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A. J.; MARTIN, T. A.; FRY, J. C.; HIOM, S. J.; WADE, W. G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.642, p.795-799, 1998.

MARQUES, J. J.; TEIXEIRA, W. G.; SCHULZE, D. G.; CURI, N. Mineralogy of soils with unusually high exchangeable Al from the western Amazon Region. **Clay Minerals**, v.37, p.651-661, 2002.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2<sup>nd</sup>ed. San Diego, CA: Academic, 1995. 889p.

MARTINY, J. B. H.; BOHANNAN, B. J. M.; BROWN, J. H.; COLWELL, R. K.; FUHRMAN, J. A.; GREEN, J. L.; HORNER-DEVINE, M. C.; KANE, M.; KRUMINS, J. A.; KUSKE, C. R.; MORIN, P. J.; NAEEM, S.; ØVREÅS, L.; REYSENBACH, A.-L.; SMITH, V. H.; STALEY, J. T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature Reviews Microbiology**, v.4, p.102-112, 2006.

MCBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils**. New York: Oxford University, 1994. 406p.

MONGODIN, E. F.; SHAPIR, N.; DAUGHERTY, S. C.; DEBOY, R. T.; EMERSON, J. B.; SHVARTZBEYN, A.; RADUNE, D.; VAMATHEVAN, J.; RIGGS, F.; GRINBERG, V.; KHOURI, H.; WACKETT, L. P.; NELSON, K. E.; SADOWSKY, M. J. Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. **Plos Genetics**, v.2, n.12, p.2094-2106, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSKERS, K.; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel eletrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Micorbiology**, Stuttgart, v.17, n.1, p.135-146, Apr. 1993.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, M. F. da; FARIA, S. M. de. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. **New Phytologist**, Cambridge, v. 121, n. 4, p. 563-570, Aug. 1992.

NOGUEZ, A. M.; ARITA, H. T.; ESCALANTE, A. E.; FORNEY, L. J.; GARCÍA-OLIVA, F.; SOUZA, V. Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest. **Global Ecology and Biogeography**, v.14, p.241-248, 2005.

OKSANEN, J.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; O'HARA, R.B. **Vegan**: community ecology package version 1.8-6. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/>>. Acesso em: 15 de dez. 2007.

OSBORN, A. M.; MOORE, E. R. B.; TIMMIS, K. N. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism T-RFLP analysis for the study of microbial community structure and dynamics. **Environmental Microbiology**, p.21, p.29-50, 2000.

PALM, C. A.; SWIFT, M. J.; WOOLMER P. L. Soil biological dynamics in slash-and-burn agriculture. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.58, p.61-74, 1996.

PEDERSEN, H.; DUNKIN, K. A.; FIRESTONE, M. K. The relative importance of autotrophic and heterotrophic nitrification in a conifer forest soil as measured by <sup>15</sup>N tracer and pool dilution techniques. **Biogeochemistry**, v.44, p.135-150, 1999.

PERES-NETO, P. R.; LEGENDRE, P.; DRAY, S.; BORCARD, D. Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. **Ecology**, v.87, p.2614-2625, 2006.

PIELOU, E. C. **The interpretation of ecological data: a primer on classification and ordination**. New York: J. Wiley, 1984. 263p.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v.14, p.817-818, 1998.

PRANCE, G. T.; RODRIGUES, W. A.; SILVA, M. F. Inventário florestal de um hectare de mata de terra firme km 30 da Estrada Manaus-Itacoatiara. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 6, n. 1, p. 9-35, mar. 1976.

QUAISER, A.; OCHSENREITER, T.; LANZ, C.; SCHUSTER, S. C.; TREUSCH, A. H.; ECK, J.; SCHLEPER, C. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. **Molecular Microbiology**, v.50, n.2, p.563-575, 2003.



R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2007. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 15 dez. 2007.

RAMETTE, A.; TIEDJE, J. M. Multiscale responses of microbial life to spatial distance and environmental heterogeneity in a patchy ecosystem. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, p.2761-2766, 2007.

ROBERTS, D. W. **Labdsv**: Laboratory for Dynamic Synthetic Vegetation Phenomenology. R package version 1.2-2. 2006. Disponível em: <<http://ecology.msu.montana.edu/labdsv/R>>. Acesso em: 15 dez. 2007.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.39-67, 2001.

SAIT, M.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P. H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. **Environmental Microbiology**, v.4, n.11, p.654-666, 2002.

SANCHEZ, P. A.; PALM, C. A.; VOSTI, S. A.; TOMICH, T. P.; KASYOKI, J. Alternatives to Slash and Burn. In: PALM, C. A.; VOSTI, S. A.; SANCHEZ, P. A.; ERICKSEN, P. J. **Slash-and-burn agriculture: the search for alternatives**. New York: Columbia University, 2005. p.3-37.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.1501-1506, 2005a.

SILVEIRA, E.L. da; PEREIRA, R.M.; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L. M.; LEMOS, E. G. D. M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1507-1516, 2006.

SMITH, C. J.; DANILOWICZ, B. S.; CLEAR, A. K.; COSTELLO, F. J.; WILSON, B.; MEIJER, W. G. T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, p.375-380, 2005.

SMYTH, T. J. Manejo da fertilidade do solo para a produção sustentada de cultivos na Amazônia. In: ALVAREZ V.; V. H.; FONTES, L. E. F.; FONTES, M. P. F. **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa, MG: SBCS/UFV/DPS, 1996. p.71-93.

SWIFT, M. J.; ANDRÉN, O.; BRUSSAARD, L.; BRIONES, M.; COUTEAUX, M- M.; EKSCHMITT, K.; KJOLLER, A.; LOISEAU, P.; SMITH, P. Global change, soil biodiversity, and nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: three case studies. **Global Change Biology**, v.4, p.729-743, 1998.

SWIFT, M. J.; IZAC, A-M. N.; VAN NOORDWIJK, M. Biodiversity and ecosystem services in agricultural landscapes – are we asking the right questions? **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.104, p.113-134, 2004.

SWOFFORD, D. L. **PAUP\***: Phylogenetic Analysis Using Parsimony \*and other methods. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2000.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.

THOMPSON, J. R.; MARCELINO, L. A.; POLZ, M. F. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. **Nucleic Acids Research**, v.309, p.2083-2088, 2002.

TÓTHMÉRÉSZ, B. Comparison of different methods for diversity ordering. **Journal of Vegetation Science**, v.6, p.283-290, 1995.

TUOMISTO, H.; RUOKOLAINEN, K.; YLI-HALLA, M. Dispersal, environment, and floristic variation of Western Amazonian Forests. **Science**, v.299, p.241-244, 2003.

TUOMISTO, H.; RUOKOLAINEN, K.; KALLIOLA, R.; LINNA, A.; DANJOY, W.; RODRIGUEZ, Z. Dissecting Amazonian Biodiversity. **Science**, v.269, p.63-66, 1995.

VESTRAETE, W.; ALEXANDER, M. Heterothrophic nitrification by *Arthrobacter* sp. **Journal of Bacteriology**, v.110, n.3, p.955-961, 1972a.

VESTRAETE, W.; ALEXANDER, M. Mechanism of nitrification by *Arthrobacter* sp. **Journal of Bacteriology**, v.110, n.3, p.962-967, 1972b.

WEHRFRITZ, J-M.; CARTER, J. P.; SPIRO, S.; RICHARDSON, D. J. Hydroxylamine oxidation in heterotrophic nitrate-reducing soil bacteria and purification of a hydroxylamine-cytochrome c oxidoreductase from a *Pseudomonas* species. **Archives of Microbiology**, v.166, p.421-424, 1997.

WOOD, M. Mechanism of aluminum toxicity to soil bacteria and possible ecological applications. **Plant and Soil**, v.171, p.63-69, 1995.

YIN, B.; CROWLEY, D.; SPAROVEK, G.; MELO, W. J. de; BORNEMAN, J. Bacterial functional redundancy along a soil reclamation gradient. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.10, p.4361-4365, 2000.

ZUL, D.; DENZEL, S.; KOTZ, A.; OVERMANN, J. Effects of plant biomass, plant diversity, and water content on bacterial communities in soil lysimeters: implications for the determinants of bacterial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.21, p.6916-6929, 2007.



## CHAPTER 4

### **STRUCTURE AND DIVERSITY OF SOIL BACTERIAL COMMUNITIES FROM THE WESTERN AMAZON AS COMPARED TO SOIL BACTERIAL COMMUNITIES OF SEMI-ARID ENVIRONMENTS**

#### **ABSTRACT**

Recently, low bacterial diversity was found in some soils of the Western Amazon when compared to soils from other environments, such as semi-arid deserts from the United States, and a high extent of variation in community composition and diversity was explained by soil pH. In the present work we compare bacterial communities from acid Western Amazonian soils to communities from temperate and desert environments in order to determine what factors are important in determining their structure and diversity. To do so, we explored diversity using the 16S rRNA gene by T-RFLP, cloning and sequencing. Soil samples representing a gradient of soil pH were collected in natural and cultivated sites in the Sevilleta desert, at the Great Basin Station, in Michigan and in the Upper Brazilian Amazon. Data were analyzed through multivariate techniques and diversity indices were also calculated. High diversity communities were found in all environments, including soils with low to intermediate pH. The main differences were observed in community structure which changed significantly along gradients of different soil attributes, especially pH and  $[K^+]$ . Although several communities could not be ranked regarding diversity, Pasture communities and one of the communities from semi-arid environment soil were considered as the most diverse of all. We can conclude that highly diverse bacterial communities can be found in Amazonian soils and that differences in community composition are related to edaphic factors.

**COMPARAÇÃO DA ESTRUTURA E DIVERSIDADE DE  
COMUNIDADES BACTERIANAS DE SOLOS DA AMAZÔNIA  
OCIDENTAL E DE AMBIENTES SEMI-ÁRIDOS DOS ESTADOS  
UNIDOS**

**RESUMO**

Recentemente, baixa diversidade de bactérias foi observada em solos da Amazônia Ocidental quando comparadas com comunidades de solos de outros ambientes, tais como desertos dos Estados Unidos, e grande parte da variação na composição e diversidade foi explicada pela sua relação com o pH do solo. No presente trabalho, comunidades bacterianas de solos ácidos da Amazônia Ocidental foram comparadas com comunidades de ambientes temperados e de deserto de modo a identificar fatores importantes para determinação da estrutura e diversidade dessas comunidades. Estas foram estudadas por análises de T-RFLP, clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA. Amostras representando um gradiente de pH foram coletadas em sistemas naturais e cultivados em Sevilleta, NM, na Great Basin Station, UT, em Michigan e na Amazônia. Os dados foram analisados com técnicas de análise multivariada e índices de diversidade foram calculados. Comunidades altamente diversas foram encontradas em todos os ambientes, incluindo solos com pH baixo e intermediário, e as principais diferenças foram observadas na estrutura das comunidades. A estrutura das comunidades mudou significativamente ao longo de gradientes de diferentes atributos do solo, especialmente pH e  $K^+$ . Embora várias comunidades não pudessem ser ordenadas com base na sua diversidade, as comunidades de pastagem e uma das comunidades de ambiente semi-árido apresentaram-se como sendo as mais diversas. Conclui-se que comunidades bacterianas com alta diversidade também podem ser encontradas na Amazônia e que a composição das comunidades estudadas está relacionada a fatores edáficos.

## 1 INTRODUCTION

The Amazonian Forest, the world's largest tropical rain forest, is known for its great above ground biological diversity. Surveys show that 100 to 300 species of trees can be present in one hectare of forest similar values to or higher than those found for other tropical forests (Gentry, 1988). Other biological groups, such as fish and insects, are also very diverse (Lowe-McConnell, 1987; Erwin, 1997). Contrary to these groups, little information is available about soil bacterial communities from the Amazon, with a few studies made so far, including studies focusing on specific groups, such as rhizobia and cultivable bacteria, as well as in the general bacterial community (Borneman & Triplett, 1997; Yin et al., 2000; Marshner et al., 2002; Jesus et al., 2005; Kim et al., 2007). One of those studies, the first applying methods independent of cultivation, found a great bacterial richness in soils of the Central Amazon (Borneman & Triplett, 1997) expressed by a large number of singletons in their 16S rRNA gene libraries.

However, a recent study showed that low bacterial diversity is present in some soils of the Western Amazon when compared to soils from other environments, such as semi-arid deserts from the United States (Fierer & Jackson, 2006). Bacterial diversity was unrelated to variables that typically predict the diversity of plants and animals in a continental scale such as temperature, latitude and potential evapotranspiration. A large extent of the differences observed in diversity and community composition could be explained by soil pH. Despite its exuberant vegetation, bacterial diversity in the studied soils is low, which would be related to the low pH of these soils. In contrast, semi-arid environments present low plant diversity, but their soils usually have high pH, which might be responsible for high bacterial diversity.

In this work we studied bacterial communities from Western Amazonian Inceptisols characterized by their low pH and extremely high Al concentrations

in order to check whether low bacterial diversity could be observed. These bacterial communities were compared to communities from some of the semi-arid environments studied by Fierer & Jackson (2006) as well as to communities from Michigan soils. Both community structure and diversity were assessed by T-RFLP analysis and 16S rRNA gene sequencing and soil attributes linked to changes in communities were identified by multivariate analysis.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### Site description and soil sampling

Soil samples were collected in Brazil, Michigan, Great Basin Experimental Range (Utah) and Sevilleta (NM) LTER, comprising natural and agricultural environments. Soil chemical attributes and geographic coordinates are presented in Table 4.1.

In Brazil, the studied sites are placed in the Benjamin Constant municipality, Amazonas State, between the geographical coordinates 4°21' and 4°26' South and 69°36' and 70°1' West, Upper Solimões River. The climate in the region is classified as Af according to Koppen's classification, with an average annual temperature of 25.7°C and an average precipitation of 2,562 mm. Inceptisols predominate in the studied sites, and some Gleysols and Alisols may also be found (Coelho et al. 2005a; Coelho et al. 2005b). Soil composite samples were collected from six different land use systems (LUS) as follows: crops, pasture, agroforestry, young secondary forest, old secondary forest and primary highland forest. Each composite sample was formed by twelve sub samples, collected at the depth of 0-20 cm, within a circle with 6 m diameter. The samples used in this study were collected in March 2004 (highest rainfall period).

In Sevilleta, sites are placed in the Sevilleta LTER station, NM, USA, at the geographic coordinates 106° 57' 47.0" West and 34° 18' 55.58" North. Soil samples were collected from beneath clumps of black grama (*Bouteloua eriopoda*), the dominant C<sub>4</sub> grass in the area, from soils in bare areas between



grass clumps and from beneath the canopy of creosotebush (*Larrea tridentata*), the dominant shrub in the area. Two composite samples were collected from each one of the chosen microenvironments, comprising a total of 6 samples. Each composite sample was constituted of five soil samples collected at the depth of 8 cm. The samples used in this study were collected in May 2006.

In the Great Basin Experimental Range the sites are placed at the Rocky Mountain Research Station, Utah, USA, at the geographic coordinates of 39° 20' 59.99" North and 111° 34' 48.01" West, at the altitude of 1783 m, and GB6, 39° 19' 47.92" North and 111° 26' 59.93" West, at the altitude of 3170 m. The dominant plant species in each site were *Juniperus osteosperma*, *Artemisia tridentata*, *Bromus tectorum* for GB5 and *Lupinus perennis*, *Bromus inermis*, *Achillea millifolium*, *Taraxicum officinales* for GB6. The samples used in this study were collected in July 2006.

In Michigan the sites are placed in the Kellogg Biological Station (KBS) LTER, MI, USA, at the coordinates 42° 24' N, 85° 24' W and at the elevation of 288 m. Annual rainfall at KBS averages 890 mm with about half falling as snow. The potential evapotranspiration (PET) exceeds precipitation for about 4 months of the year. Mean annual temperature is 9.7°C. Soil samples were collected in duplicates from the following treatments: conventional corn/soybean/wheat conventional till (T1), mid-successional community never tilled (T8) and deciduous forest (DF) in 2005.

Chemical and physical soil attributes were analyzed at the Department of Soil Science (Federal University of Lavras, Brazil), according to methodologies compiled by Embrapa (1997), and at the Department of Crop and Soil Sciences (Michigan State University, USA), according to the Recommended Chemical Soil Test Procedures for the North Central Region (1988).

TABLE 4.1 Identification of sampling sites, represented land use systems (LUS), geographic coordinates and soil chemical attributes<sup>1</sup>.

Sites		Latitude	Longitude	pH	P	K	Ca	Mg	t	MO
1	YSF	9510585	399273	4.4	3.7	45	3.1	2.1	12.1	1.5
4	Forest	9510567	399481	4.5	4.6	78	6.2	2.3	13.1	1.5
5	Forest	9510489	399257	4.7	4.9	74	4.9	2.7	12.2	1.5
10	Forest	9510293	399441	4.7	5.5	47	3	1	10.2	1
14	Forest	9510503	399169	4.4	4.9	48	3.9	2	12.2	1.8
16	Forest	9510316	399149	4.5	4.6	53	4.3	1.6	10.2	2.2
17A	Agroforestry	9512773	399116	4.7	3.1	48	6.5	2	12.2	1.6
17	Agroforestry	9512734	399260	4.8	6.5	77	7.9	1.6	12.3	2.2
18	Crops	9512543	399207	5.2	2.3	42	6.7	1.6	9.2	1.4
19	Crops	9512451	399181	6	3.1	89	12.4	2.7	15.3	2.1
23	OSF	9512615	398918	4.7	2.8	58	5.2	1.9	12.1	1.8
24	Agroforestry	9512472	399086	5	4.3	34	5.2	1.9	9.2	1.8
25	Agroforestry	9512666	399137	4.8	4.6	69	10.6	3	16.6	1.9
27	Crops	9512688	399032	5	3.1	74	12.9	3	16.4	2.2
28	Crops	9512401	398969	4.9	4	106	8	2	15.7	1.6
29	YSF	9512497	398990	5.2	2	72	8.3	2.6	12.7	1.9
31	YSF	9512717	398942	5	2.3	58	8.5	4.1	15.3	1.9
32	Crops	9512824	398968	4.7	6.5	122	8.6	1.7	16	1.6
81	OSF	9514230	386877	4.1	4.9	34	1.8	1.1	10.7	1.9
82	Pasture	9514234	386972	5.2	2.8	39	2.3	1.7	7.5	1.4
84	Pasture	9514249	387169	5.1	3.1	67	1.8	2.1	6.4	1.8
88	OSF	9514332	386890	4.2	3.4	41	1	0.6	9	1.8

Continua...

TABELA 4.1, Cont.

90	OSF	9514128	386881	4.2	5.2	52	1.5	0.4	9	1.4
91	Pasture	9514042	386982	5.3	2.5	30	1.5	0.6	4	1.3
92	Pasture	9514136	387157	4.9	2.5	48	2.8	2.2	9	1.6
95	Pasture	9514045	387268	5.2	2.8	31	1.9	1.7	6	1.3
T1R1	Conventional till	4696932	633984.6	5.3	28	88	2.8	1.2	5.4	1.3
T1R2	Conventional till	4696480	634094.6	5.4	34	97	3.1	1.5	6.1	1.4
T8R1	Mid-successional community	4695905	633936.7	5.3	37	163	3.2	1	10.6	2.1
T8R2	Mid-successional community	4695855	633955.6	5.7	48	157	3.5	1	8.5	4.4
DFR1	Deciduous forest	4695901	632349	5.1	70	44	2.1	0.7	11.4	3.6
DFR2	Deciduous forest	4696383	631958.3	4.6	22	94	1.5	0.5	10.7	2.5
Open1	Open area	3799377	319667	8.6	9	394	19.5	1.7	22.2	1.3
Open2	Open area	3799377	319667	8.7	6	393	20.6	2	23.5	1.3
Creo1	Creosote bush	3799377	319667	8.5	38	472	16.6	1.4	19.2	1.2
Creo2	Creosote bush	3799377	319667	8.3	47	482	14.7	1.4	17.3	1.4
Eri1	<i>Bouteloua eriopoda</i>	3799377	319667	8.5	29	272	17	1.4	19.1	1.2
Eri2	<i>Bouteloua eriopoda</i>	3799377	319667	8.6	22	275	17.9	1.4	20.1	1.3
	<i>Juniperus osteosperma, Artemisia</i>									
GB5	<i>tridentata, Bromus tectorum Lupinus</i> <i>Lupinus perennis, Bromus inermis,</i>	4355778	450025	8.3	18	219	21	1.8	23.4	3.6
GB6	<i>Achillea millefolium, Taraxicum</i>	4353495	461215	7.8	52	298	13.1	3.8	17.7	3.6

<sup>1</sup> Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> and effective cation exchange capacity (t) are expressed in cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>; P and K are expressed in mg.dm<sup>-3</sup>; Organic matter (MO) is expressed in OM, dag.dm<sup>-3</sup>. <sup>2</sup>Land use systems: YSF, young secondary forest; OSF, old secondary forest. Samples 1-95 are from Brazil, geographic coordinates are in UTM projection, WGS84, zone 19S; Samples T1R1, T1R2, T8R1, T8R2, DFR1 and DFR2 are from Michigan, USA, geographic coordinates are in UTM projection, WGS84, zone 16N; Samples Open1, Open2, Creo1, Creo2, Eri1 and Eri2 are from Sevilleta, NM, USA, geographic coordinates are in UTM projection, WGS84, zone 13N; Samples GB5 and GB6 are from the Great Basin Experimental Range, Utah, USA, geographic coordinates are in UTM projection, WGS84, zone 12N;

### **DNA extraction and 16S rDNA amplification**

Five grams (dry weight) of each soil sample were used for DNA extraction. DNA was extracted with the Power Max Soil DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories Inc.), according to the manufacturer's instructions, quantified by using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technology) and stored at -20°C until use. The 16S rDNA gene was amplified with the primers 63F labeled with 6-carboxyfluorescein (6-FAM/CAGGCCTAACACATGCAAGTC) and 1389R (ACGGGCGGTGTGTACAAG) (Marchesi, 1998; Osborn et al., 2000) in a Robocycler Gradient 96 PCR machine (Stratagene). Thirty micro liter reactions were performed in triplicate for each sample. The reactions contained 0.002U  $\mu\text{L}^{-1}$  Taq DNA polymerase, 1X reaction buffer, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM of each dNTP, 0.2  $\mu\text{M}$  of each primer, 400 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  BSA and 0.6 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  of template. The following conditions were chosen for amplification after optimization: initial denaturation for 2 min. at 94°C; 25 cycles with 1 min. at 94°C for denaturation, 1 min. at 58°C for annealing, and 2 min. at 72°C for extension; and final extension for 10 min. at 94°C. Five micro liter aliquots of each reaction were 10-fold diluted in 50- $\mu\text{L}$  reactions with the same composition and were cycled three times using the same conditions presented above. After analyzing the PCR products by gel electrophoresis, triplicates were combined and then purified with the Qiagen PCR purification kit. The same conditions were used for DNA amplification from some of the studied samples with the primers 27F labeled with 6-carboxyfluorescein (6-FAM/AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) and 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) for comparisons with the primers 63F and 1389R (Lane, 1991).

### **Klenow fragment treatment, restriction digestions and T-RFLP analysis**

Purified PCR products were treated with the Klenow fragment according to Egert and Friederich (2005) (5U of Klenow fragment exonuclease minus per

micro liter of DNA, 10  $\mu\text{L}$  of 10X reaction buffer, and 50  $\mu\text{M}$  of each deoxynucleoside triphosphate in a total volume of 100  $\mu\text{L}$  for 1 h, at 20°C in the dark) and purified again with the Qiagen PCR purification kit. Forty nanograms of the purified PCR products were digested with the enzymes MspI and HhaI in 15- $\mu\text{L}$  separate reactions during 3 hours at 37°C. Restriction reactions were performed in duplicate for each sample. DNA was precipitated overnight with 1.5  $\mu\text{L}$  of 3 M sodium acetate solution, 0.3  $\mu\text{L}$  of glycogen (20 mg.  $\mu\text{L}^{-1}$ ) and 42  $\mu\text{L}$  of absolute ethanol (Gallagher et al., 2005). After that it was centrifuged for 35 min. at 14,000 RPM and the supernatant was discharged. The precipitated DNA was washed with 70% ethanol during 5 minutes, centrifuged again for 35 minutes and dried with the speedy vacuum. The DNA pellets were resuspended in 9.85  $\mu\text{L}$  of deionized formamide and 0.15  $\mu\text{L}$  of ROX size standard 15 minutes before the analysis (Gallagher et al., 2005) in a ABI system analyzer. All volume was used for analysis. The same procedure was used for reaction products obtained with the primers 27F and 1492R, except for the Klenow fragment treatment and only the enzyme HhaI was used.

#### **Clone library construction**

The following samples were selected for clone library construction based on the T-RFLP analysis was follows: Forest, F10 and F16; Secondary Forest, SF81 and SF90; Pasture, P82 and P84; Crops, C19 and C27; Creosote bush, Creo1 and Creo2. The same PCR conditions used for T-RFLP analysis were used for clone library construction except that the forward primer, which was not labeled. Triplicates were combined and purified with the Qiagen PCR purification kit. Cloning was performed by using the TOPO TA Cloning Kit for Sequencing according to the manufacturer's instructions. Partial sequences were obtained by using the primer 63F for amplification reactions in ABI 3700 system analyzer at Macrogen.

### **Data Analysis**

All statistical analyses were made with the packages Vegan (Oksanen et al., 2007), labdsv (Roberts, 2007), and Biodiversity.R (Kindt & Coe, 2005) for the program R (R Development Core Team, 2007). Besides, sequence data were also analyzed with DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005).

### **T-RFLP**

Firstly, the baseline was determined for each profile by using Perl and the R package, according to the IBEST approach (Abdo et al., 2006). Data were then exported and analyzed by using T-Align (Smith et al., 2005). Data for the two restriction enzymes (HhaI and MspI) were combined in one matrix for statistical analysis. This matrix was submitted to Wisconsin double standardization and a dissimilarity matrix was calculated by using the Bray-Curtis index and then submitted to non-metric multidimensional scaling (NMDS). Soil chemical and physical variables were regressed against the NMDS scores and fitted to the ordination as vectors. Clustering analysis was performed by using the Bray-Curtis index and the average linkage algorithm.

### **Phylogenetic analysis**

All sequences were uploaded on the RDP website and analyzed by using the RDP tools (release 9.56). Sequences were examined for the presence of chimeras with the programs Bellerophon (with the Huber-Hugenholtz correction) (Huber et al., 2004), Mallard (Ashelford et al., 2006), Chimera Check (Maidak et al., 1999) and Pintail (Ashelford et al., 2005) and potential chimeric sequences were excluded from downstream analyses. The selected sequences were used to search for the most similar sequences with the RDP seqmatch tools and the aligned sequences were downloaded together with the query sequences. Alignments were edited manually and with the program GBlocks by using parameters adjusted according to recommendations for DNA sequences (Castresana, 2000) before Phylogenetic analysis. Tests for choosing

the most appropriate nucleotide substitution models were performed with PAUP\* version 4.0b10 for Windows (Swofford, 2000) and ModelTest (Posada & Crandall, 1998). Phylogenies were constructed with the Tamura Nei model plus gamma correction and the neighbor-joining algorithm by the program MEGA 4 (Tamura et al., 2007).

DOTUR was used for diversity index calculations. Distance matrices used for DOTUR were calculated by PAUP\* (Swofford, 2000) for the edited alignments. The Tamura Nei distance with gamma correction and the furthest neighbor sequence assignment method were used. Renyi diversity profiles (Tóthmérész, 1995; Kindt & Coe, 2005) were also constructed to order communities according to diversity.

An applet developed by Ribosomal Database Project (Cole et al., 2007) was used to generate matrices with OTUs defined at different levels of dissimilarity. The matrix with OTUs defined at the level of 3% of dissimilarity was chosen for redundancy and clustering analyses. Redundancy analysis was performed with Hellinger-transformed data as advised elsewhere (Legendre & Gallagher, 2001) and clustering was performed with the Bray-Curtis distance and the average linkage algorithm.

### 3 RESULTS

**T-RFLP analysis.** We performed comparisons between the primer sets 63F-1389R and 27F-1492R for 18 of our samples and more peaks were usually obtained by T-RFLP analysis when the primer set 63F-1389R was used (Table 3.2). When the observed number of peaks was higher by using the primer set 27F-1492R the difference was usually low. Since the primer set 63F-1389R allowed us to detect more OTUs than the primer set 27F-1492R in most of our samples, we chose the first set for further analyses.

TABLE 3.2 Number of peaks obtained after digestion of amplification products of the 16S rRNA gene amplified with the primer sets 63F-1389R and 27F-1492R. Digestion was performed with the enzyme HhaI.

Sites	63F-1389R	27F-1492R
4	61	45
5	50	37
10	65	42
14	61	38
16	72	42
92	50	34
95	56	38
23	62	46
19	63	41
27	78	27
28	68	46
17	81	27
17A	71	46
24	57	39
25	62	48
T1R1	83	68
T1R2	88	55
T8R1	71	72
T8R2	71	72
DFR1	64	49
DFR2	70	45
Open1	41	46
Open2	37	43
Creo1	41	51
Creo2	55	55



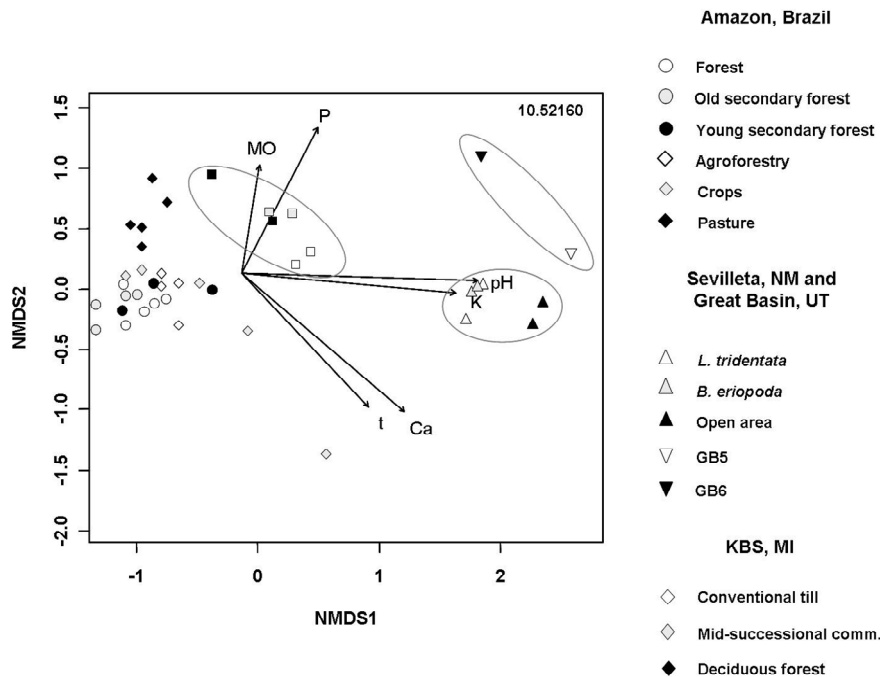


FIGURE 4.1 Nonmetric multidimensional scaling analysis showing the ordination of sampling sites based on the structure of bacterial communities as determined by T-RFLP analysis. Vectors for environmental variables with a significance of 5% or less are shown

A large variation in structure can be observed among the studied communities as shown by the NMDS analysis (Figure 4.1). Communities from Amazonian soils and semi-arid environments are in the opposite sides of the ordination graphic while communities from MI are in between and closer to Pasture, Crop and Young Secondary Forest sites of Amazon, which have some soil attributes more similar to MI soils.

Regression of soil attributes on the site scores show that differences on the structure of communities are significantly related to changes in nutrient concentration (P, K<sup>+</sup> and Ca<sup>+2</sup>), cation exchange capacity, organic matter and pH (Figure 4.1). The largest variance of the site scores in the graphic is on the first

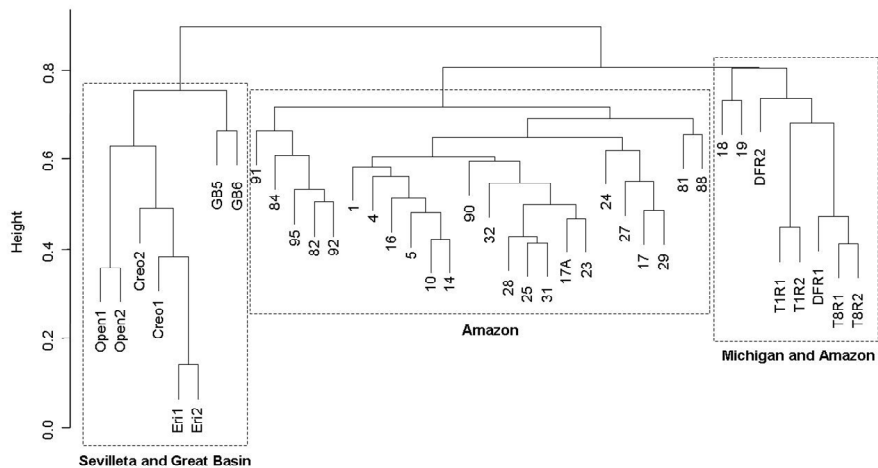


Figure 4.2 Dendrogram showing distances between sampling sites based on bacterial community composition as determined by T-RFLP analysis. The linkage average algorithm and the Bray-Curtis distance were used. See table 4.1 for details about samples.

axis and is related to pH and  $[K^+]$ . Communities from semi-arid environments are related to high pH and nutrient concentrations; Amazonian communities are related to low to intermediate pH and nutrient concentrations. Communities from MI are related to intermediate pH and intermediate nutrient concentration. Three main groups of bacterial communities can be identified by clustering based on community structure as assessed by T-RFLP analysis (Figure 4.2). One group is formed by communities from semi-arid environments; another by the MI communities and two communities from crop sites of Brazil; and the other for communities from Brazil only. The two Brazilian communities that clustered with MI communities come from cultivated sites, which presented soil pH and V% values amongst the highest found for the Brazilian samples and which are close to those found in the MI soil samples (Table 4.1).

**Clone libraries.** Based on the T-RFLP results we selected some samples from Brazilian sites and from sites under Creosote bush plants of Sevilleta in order to build clone libraries with the 16S rRNA gene in order to obtain a fine view of the composition of these communities. We recovered 812 partial sequences of the 16S rRNA gene after disregarding potential chimeras. The number of sequences in each library is as follows: C19, with 72 sequences; C27, with 83 sequences; P82, with 77 sequences; P84, with 80 sequences; SF81, with 81 sequences; SF90, with 88 sequences; F10, with 87 sequences; F16, with 86 sequences; and SV1 and SV2, with 79 sequences each. These sequences were assigned to phyla Acidobacteria (35.5%), Actinobacteria (5.9%), Bacteroidetes (7.5%), Chloroflexi (0.7%), Firmicutes (2.0%), Gemmatimonadetes (1.1%) and Proteobacteria (41.5%), including the classes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  of Proteobacteria (Figure 3.3). Only 5.8% of the sequences were not assigned to any phylum.

Acidobacteria and Alphaproteobacteria were the most abundant phyla in the studied communities (Figure 4.3). Acidobacteria was abundant in the Brazilian soils and twelve groups belonging to this phylum were distributed among the different land use systems (Figure 4.4a). Gp1 was by far the most abundant of these groups. In contrast, Acidobacteria was not as abundant in Sevilleta as in Brazil and only gp 4 and gp 6 were found. Some close representatives of these gp4 and gp6 were shared between Brazilian crop sites and Sevilleta soils.

Most of the sequences of Alphaproteobacteria were assigned to the order Rhizobiales (Figure 4.4b). A large number of them could not be assigned to deeper taxonomic groups and were identified as unknown Rhizobiales. Orders with less abundance are Rodhobialles, Caulobacterales and Sphingomonadales. Few sequences of Rhodobialles were found both in Brazil and Sevilleta. Regarding Caulobacterales, most of the sequences belonging to this order were recovered from crops and were assigned to the genus *Brevundimonas*. Regarding

Sphingomonadales, sequences were recovered from pasture, crops and Sevilleta soils. No sequence belonging to this order was found in areas with natural vegetation in Brazil. Betaproteobacteria were mostly found in Brazil, with *Burkholderia* in the Forest and *Herbaspirillum* in the Pasture and Crops (Figure 4.4c). Gammaproteobacteria were especially abundant in Forest and Secondary Forest sites and just a few sequences belonging to these groups were found in Crop sites and in Sevilleta. Deltaproteobacteria sequences were mainly from Sevilleta and Pasture sites in Brazil, with a few sequences from Forest, OSF and crops (Figure 4.4c). Bacteroidetes are more abundant in Pasture and Crop systems and some sequences from Sevilleta are present. Just a few sequences were found in the Forest (Figure 4.4d). Firmicutes were found only in Forest and Secondary Forest sites. More Actinobacteria sequences were found in Brazil, including several *Arthrobacter* sequences.

Groups formed at the level of 97% of similarity were considered for further analyses. We chose this cut-off since there is good correlation between classifications based on DNA hybridization and on the 16S rRNA gene for this level of similarity (Rosselló-Mora & Amann, 2001). Besides, when different cut-offs for species definition were used (99-95% of similarity as found in the literature) similar ordination and clustering results were obtained (data not shown), what means that different cut-off for species definition would not lead to significant differences in the results. Libraries cluster according to pH (Figure 4.5). Communities from Forest and OSF which are in soils with the lowest pH values constituted one cluster; communities from Pasture and C27 which are in soils with intermediate pH values, constituted another cluster; community C19, which is from the soil sample with the highest pH in Brazil, was placed separated from the others Brazilian communities; and communities from semi-arid environments which are from the soils with the highest pH of all, clustered apart. Ordination performed with sequence data also shows the same trend in

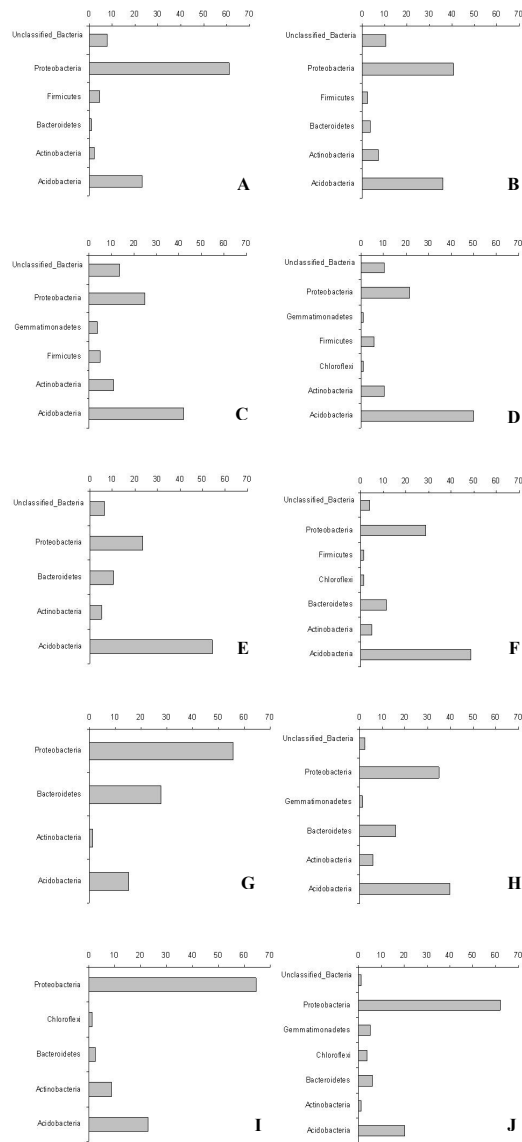


FIGURE 4.3 Relative abundance of members of different phyla found in clone libraries built for Brazilian and US samples. (A) to (J) refers to samples F10, F16, SF81, SF90, P82, P84, C19, C27, SV1 and SV2, respectively. F, SF, P, C and SV indicate Forest, Secondary Forest, Pasture, Crop and Sevilleta.

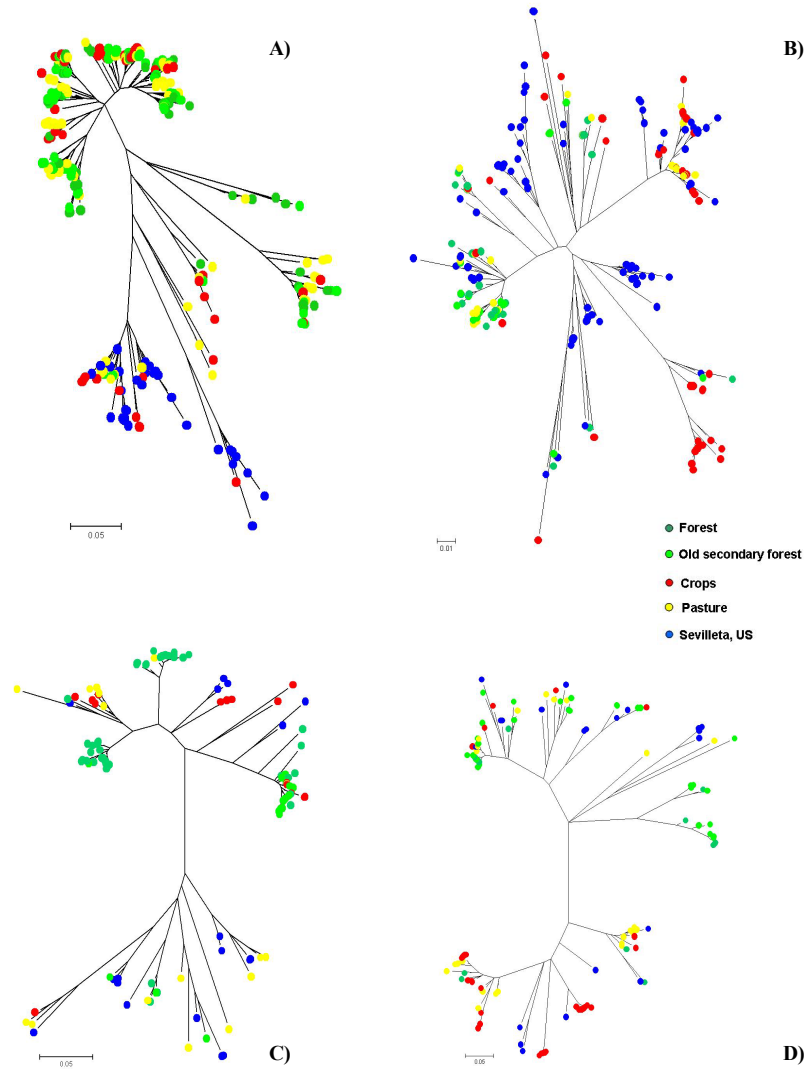


FIGURE 4.4 Phylogenetic trees for sequences of Acidobacteria (A), Alphaproteobacteria (B),  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -Proteobacteria (C) and Firmicutes/Actinobacteria/Gemmatimonadetes/Bacteroidetes (D) from Brazilian and US clone libraries. Colors indicate the origin of the sequences. The trees give an idea of diversity and compositional similarity among the different environments.

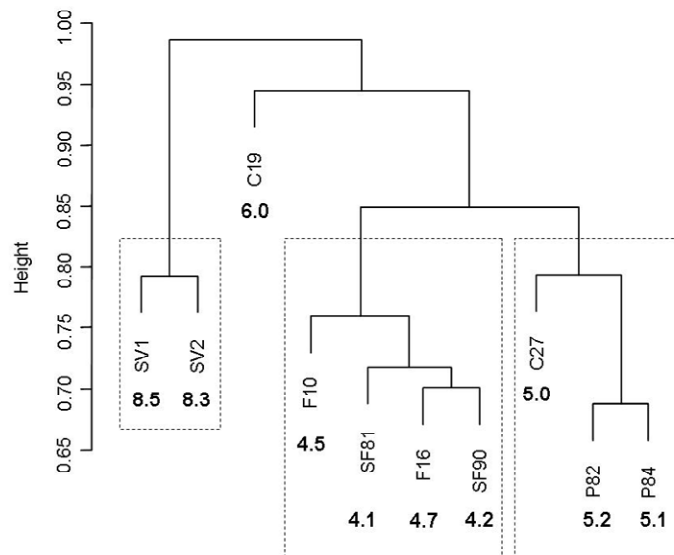


FIGURE 3.5 Dendrogram showing distances between sampling sites based on bacterial community composition as determined by 16S rRNA gene sequencing. The cut-off of 97% of similarity was used for OTU definition. The linkage average algorithm and the Bray-Curtis distance were used. Numbers in boldface indicate the pH for each soil sample. US samples: SV, Sevilleta; Brazilian samples: C, Crop; F, Forest; P, Pasture; SF, Secondary Forest.

community structure that was shown by T-RFLP analysis (Annex, Figure A5). Sevilleta communities are related to high pH and nutrient concentrations and Forest and Secondary Forest communities to low pH and nutrient concentrations. Four main groups can be identified as in the cluster analysis including Forest and Secondary Samples in one group, Pasture and C27 samples in the second, C19 in the third and Sevilleta samples in the fourth.

**Richness and diversity indices.** A large number of peaks were found when both restriction enzymes were used, with numbers varying between 55 and 88 for

TABLE 4.3 Number of peaks obtained after digestion of amplification products of the 16S rRNA gene amplified with the primer sets 63F-1389R.

Sites	HhaI	MspI	Sites	HhaI	MspI
1	66	95	82	62	83
4	61	78	84	68	101
5	50	73	88	58	62
10	65	88	90	59	73
14	61	78	91	57	80
16	72	83	92	50	79
17	59	76	95	56	78
17A	81	82	T1R1	83	109
18	86	92	T1R2	88	99
19	63	81	T8R1	71	89
23	62	69	T8R2	71	103
24	57	56	DFR1	64	96
25	62	83	DFR2	70	76
27	78	72	Open1	41	47
28	68	68	Open2	37	51
29	76	74	Creo1	41	68
31	62	81	Creo2	55	53
32	62	77	Eri1	58	71
81	56	85	Eri2	55	65

Hha, and 68 and 109 for Msp (Table 4.3). Regarding the number of peaks the 10 richest samples are from Amazon and MI. Samples from the open area of the semi-arid environments presented the lowest number of peaks as expected.

Sequence data were used for further analyses, such as building accumulation curves and calculating diversity indices since it gives phylogenetic



information that could not have been detected by T-RFLP analysis. Collector curves of all clone libraries built with the number of OTUs and the Chao1 estimator did not reach the asymptote (Annex, Figure A4), showing that more sequences would be necessary in order to make reliable richness estimates. For this reason, we compared the data based on the observed diversity.

We built Renyi diversity profiles in order to rank communities based on diversity. Since two or more communities may be ranked differently according to the index used methods especially devised with this aim, such as Renyi profiles, must be used (Tóthmérész, 1995; Kindt et al., 2006). Moreover, since the number of sequences in each library was different we rarefied the sequences in the studied communities in order to allow comparisons at the same sample size. Accumulation curves show that in general  $H_\alpha$  values did not stabilize (Figure 4.6), indicating that different values could be obtained if more sequences were collected. Nevertheless, these curves tend to reach the asymptote, what shows that the addition of new sequences will not reflect in great differences between the current and new values. Stable values of  $H_{inf}$  were obtained for communities F10, F16, SF90 and C19, and stable values of  $H_2$  were obtained for communities F10 and C19.

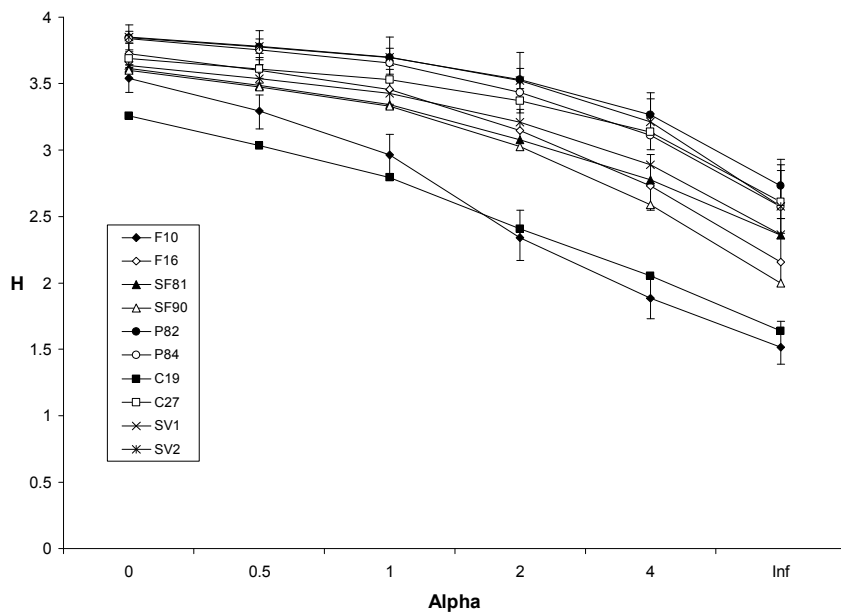


FIGURE 4.7 Renyi diversity profiles for soil bacterial communities considering the cut-off of 97% of similarity for OTU definition. The values 0, 1, 2 and inf in the x axis refer to the species richness, Shannon diversity, Simpson diversity and Berger-Parker diversity, respectively. Communities whose curves intersect cannot be ordered according to diversity. Sample size was standardized in relation to sample C19 for comparisons. F, SF, P, C and SV indicate Forest, Secondary Forest, Pasture, Crop and Sevilleta.

Samples can be divided into three different groups based on richness ( $H_0$ ) (Figure 4.7 and annex Figure A6). The first group is formed by Pasture samples and SV2, which present the highest richness, the second group is formed by Forest and Secondary Forest samples and C27, which present intermediate richness compared to samples in the first group, and the third group is formed by sample C19, with the lowest richness. The profile of C27 intersects the profiles of samples P82 and P84 and did not differ from SV2 as indicated by the overlapping of their confidence intervals. The confidence intervals of sample F16 also overlap the confidence intervals of samples P82 and P84 and this

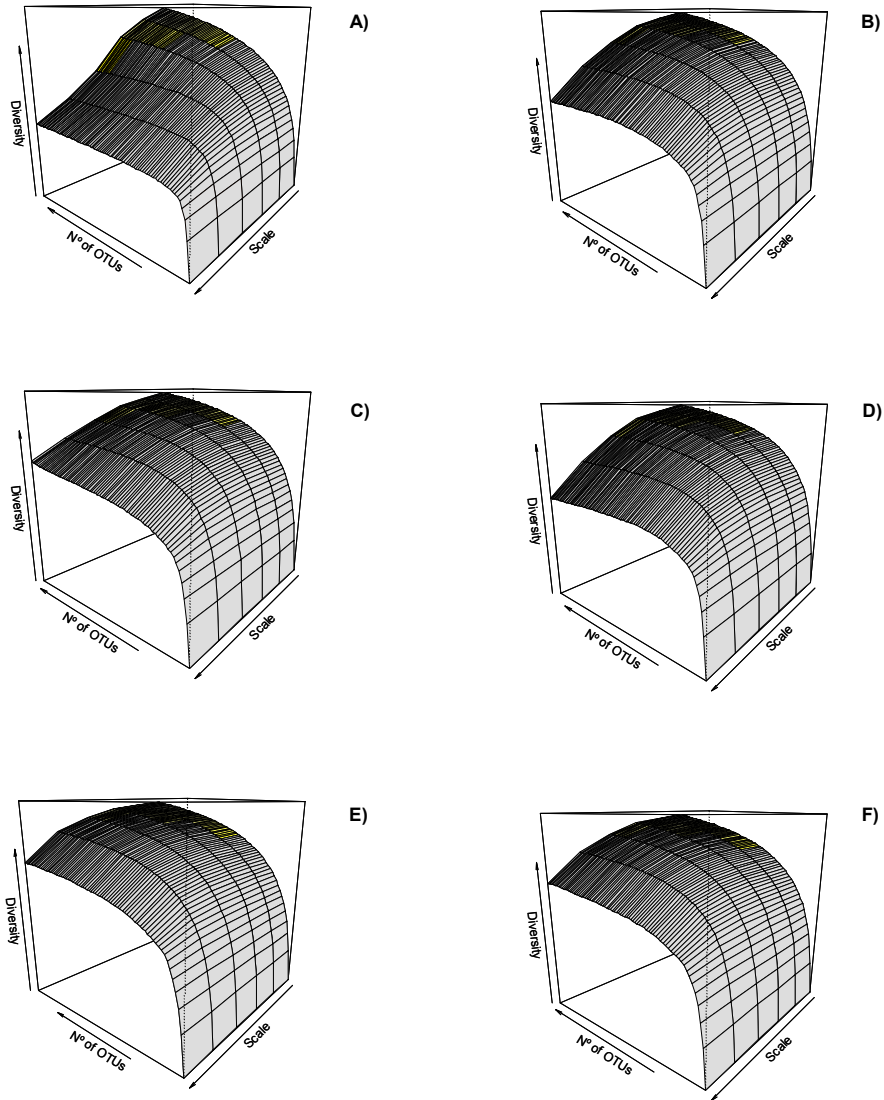


FIGURE 3.6 Accumulation curves for Renyi diversity profiles of soil bacterial communities considering the cut-off of 97% of similarity for OTU definition. The values 0, 1, 2 and inf in the x axis refer to the species richness, Shannon diversity, Simpson diversity and Berger-Parker diversity, respectively. A) F10; B) F16; C) SF81; D) SF90; E) P82; F) P84. F, SF, P, C and SV indicate Forest, Secondary Forest, Pasture, Crop and Sevilleta.

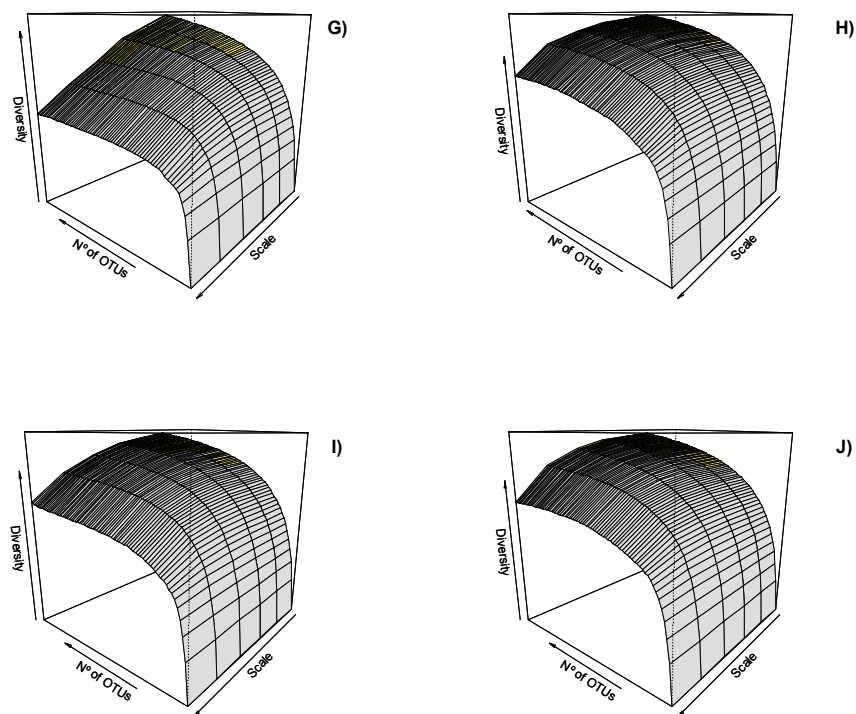


FIGURE 3.6 (cont.). Accumulation curves for Renyi diversity profiles of soil bacterial communities considering the cut-off of 97% of similarity for OTU definition. The values 0, 1, 2 and inf in the x axis refer to the species richness, Shannon diversity, Simpson diversity and Berger-Parker diversity, respectively. G) C19; H) C27; I) SV1; J) SV2. F, SF, P, C and SV indicate Forest, Secondary Forest, Pasture, Crop and Sevilleta.

sample is as diverse as one of the samples of Sevilleta (SV1). The profile of F10 intersects the profile of C19.

#### 4 DISCUSSION

Recently, pH was presented as the main environmental variable driving soil bacterial diversity and phylotype richness in a continental scale (Fierer & Jackson, 2006) and a positive correlation between pH and diversity was

observed. Soils with high pH (pH ~ 8.0) and low plant diversity from semi-arid environments were presented as harboring the highest bacterial diversity and acid soils (pH = 3.5 - 4.6) with high plant diversity from the Western Amazon, as harboring the lowest bacterial diversity. We selected soil samples from some of these semi-arid environments (Sevilleta LTER and Great Basin Experimental Range) for comparisons with samples from acid and Al rich tropical soils of the Brazilian Western Amazon in order to check whether we would find changes in community structure and lower bacterial diversity associated to pH as well as to other soil attributes. Samples from Michigan soils under natural and agricultural vegetation were also examined. T-RFLP analysis and 16S rRNA gene sequence data were used to assess changes in the structure of bacterial communities and 16S rRNA gene sequence data were used for the calculation of diversity indices. We preferred sequence data to T-RFLP data, since phylogenetic information cannot be obtained accurately by using T-RFLP and because of the coarse resolution of the community composition obtained by using this method (Tiedje et al., 1999; Marsh, 2005).

When the primer set 63F-1389R was used T-RFLP profiles from the Amazonian bacterial communities which we studied have a number of peaks three to four times higher than the number of peaks observed by Fierer & Jackson (2006) for soil bacterial communities from the Peruvian Amazon. T-RFLP profiles obtained by using the same primer set (27F-1492R) used by Fierer & Jackson (2006) have a number of peaks twice as great as the number of peaks observed by these authors for the same bacterial communities. On the other hand, the difference in the number of peaks among communities from Sevilleta in the two studies was low, since we observed between 37-58 peaks when both primer sets were used, depending on the type of vegetation, while Fierer & Jackson (2006) observed between 41 and 43 peaks in sites of the same area. We are aware that differences in methodology may be a limitation to direct

comparisons between the two studies, but these results can indicate that richer soil bacterial communities are present in the Amazonian soils which we studied compared to the soil bacterial communities studied by Fierer & Jackson (2006).

Clear differences were identified in bacterial community structure by T-RFLP and sequencing analyses and relationships between structure and changes in the soil attributes could be detected. Changes on community structure are significantly related to pH and P, K and Ca concentrations. Brazilian, MI and semi-arid bacterial communities were clearly separated along a gradient of pH and  $[K^+]$ . Besides, communities clustered according to pH (Figure 4.5), what shows that this is an important variable driving changes in community composition. It should be stressed that these are not continuous gradients, since sampling points are thousands of kilometers apart. Nevertheless, it can be noticed that soils with more similar attributes tend to present bacterial communities with closer composition.

Besides its direct effect, the indirect effect of pH must also be considered. The pH is considered by soil scientists as a master variable in the soil environment, that is, it controls several chemical processes occurring in the soil (McBride, 1994), and changes in these processes can affect bacterial communities. Different underlying mechanisms are in action in low and high pH soils and such differences should be considered when discussing the effect of pH on soil bacterial communities. In acid tropical soils the effects of pH are associated to Al availability, which is responsible for generating acidity in the soil solution and whose concentration increases as pH decreases. Those effects are also associated to the low availability of some nutrients, such as Ca and Mg (McBride, 1994). In contrast, high pH like that observed in Sevilleta soils may be related to salinity as indicated by the high  $[K^+]$  concentrations found in these soils, toxicity of some ions (e.g. Cl<sup>-</sup>) and nutritional imbalances (McBride, 1994). Salinity was recently shown to be an important factor driving the

structure and diversity of microbial communities in different environments such as soil, sediments and water (Lozupone & Knight, 2007). It is possible to note that both the occurrence and abundance of some bacterial groups are related not only to pH, but also to different soil conditions in our samples, including nutrient availability. Thus, we can conclude that different factors besides soil pH are affecting bacterial communities in Brazil, MI and Sevilleta.

Moreover,  $[Al^{+3}]$  is extremely high in the studied soils (Table 4.1) and this can be a more limiting factor than pH. Some authors argue that the Al present in some soils of the region that we studied may not be biologically available because it is in the inter layers of clay minerals (Gamma & Kiehl, 1999; Marques et al., 2002). However, essays performed in the Soil Microbiology Laboratory at UFLA with common beans planted in those soils indicate that this Al can be biologically available<sup>1</sup>. Moreover, there is a negative correlation between pH and  $[Al^{+3}]$ , what agrees with the current knowledge about the relationship between these two variables in the soil solution (McBride, 1994). Low soil pH in Brazil is linked to high Al concentrations in the soil solution as well as to the lower availability of some nutrients (Table 4.2). Even though, there is still a high concentration of some nutrients in the Brazilian soils, especially Ca, according to agronomic parameters.

Our results confirm that soils from semi-arid environments harbor very diverse communities (Fierer & Jackson, 2006), but they also show that similar diversity can be found in Amazonian soils. Several of these communities could not be ranked based on diversity, including one community from Forest and other from Sevilleta, as shown by the intersection of Renyi diversity profiles. Moreover, clear ranking patterns related to diversity and soil pH were not observed. Communities from Pasture and one community from Sevilleta are the most diverse among all bacterial communities.

---

<sup>1</sup> Moreira et al., unpublished data.

Although semi-arid environments are known for their limitations in nutrient and water availability (Hardley & Szarek, 1981), resources are available for bacterial communities in the area beneath plants. This distribution is more uniform in desert grasslands, but in shrublands, such as creosote bush shrublands most of the nutrients are found under shrubs rather than in areas between them, which leads to a patchy distribution of the resources (Schlesinger et al., 1996; Kieft et al., 1998; Schlesinger & Pilmanis, 1998). Microbial populations and activity as well as soil moisture were also reported to be higher beneath shrubs than between them (Hereman et al., 1995; Kieft et al., 1998; Ewing et al. 2007; Housman et al., 2007). Moreover, environmental heterogeneity should be considered besides environmental productivity. High productive but highly homogenous environments are known by their low biological diversity compared to low productive but highly heterogeneous environments (Ricklefs, 1996). Great spatial and temporal variability may be observed in desert environments. These characteristics may be responsible for the high bacterial diversity in soils under desert plants. When compared to the number of phylotypes from soil samples collected under vegetation, the number of phylotypes observed in open areas of Sevilleta was low, indicating that diversity is being increased in the sites beneath plants.

Analysis of 16S rRNA gene sequences shows differences in phylum and family composition between Brazilian and Sevilleta libraries. They were detected mainly in Acidobacteria and Alphaproteobacteria, as shown by the analysis of sequences of the gene 16S rRNA. These groups account for most of the sequences recovered from the studied communities. Sequences belonging to the group 1 of Acidobacteria, which was found to be widespread in the environment (Barns et al., 1999), dominate in the Brazilian soils and representatives of this group were also found in a previous study in the Amazon (Borneman & Triplett, 1997). Isolates of gp1 grow better in acid than in neutral



culture medium, are abundant in libraries from soils with pH <6 and are rare or absent from libraries from soils with pH >6.5 (Sait et al., 2006). Contrary to Barns et al. (1999), who did not find members of gp3 in acid soils, gp3 was the second group with the larger number of sequences in the Brazilian soils, even in those with very low pH (Table 4.2), such as Forest and Secondary Forest soils. Gp4 and gp6 sequences dominate in the soils of Sevilleta, indicating that these groups are more frequent in neutral to alkaline pH soils. Regarding Alphaproteobacteria, the variety of sequences and families was higher in Sevilleta than in the Amazonian soils.

We can conclude that bacterial communities as diverse as those found in alkali soils can be found in acid soils and that soil attributes play an important role in driving the structure of these communities. Our findings confirm previous studies which show that bacterial community structure can be linked to changes in the soil attributes, specially pH and related variables. However, more studies addressing this topic should be made in order to clear out these relationships. Just a few fractions of the environments of tropical forest were studied and more studies are necessary before drawing general conclusions. The improvement of new sequencing technologies and the decrease in the cost of sequencing projects may allow the construction of libraries with large number of sequences, which will allow a greater resolution of the structure and diversity of bacterial communities.

## **5 ACKNOWLEDGMENTS**

We acknowledge the Global Environmental Facility/United Nations Environment Programme (GEF/UNEP project CSM-BGBD/GF2715-02 with the global coordination of CIAT/TSBF) and the Center for Microbial Ecology (Michigan State University) for the financial support, the Capes foundation for the “sandwich” fellowship provided to Ederson da C. Jesus and the CNPq for F. M. S. Moreira research fellowship. We thank you Dr. E. Durant McArthur from

the Rocky Mountain Research Station and Dr. Mike T. Friggens and Scott L. Collins from the Sevilleta LTER and University of New Mexico for collecting the soil samples in the Great Basin Experimental Range and Sevilleta and for helping with information about the collection sites.

## 6 REFERENCES

ABDO, Z.; SCHÜETTE, U. M. E; BENT, S. J.; WILLIAMS, C. J.; FORNEY, L. J.; JOYCE, P. Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. **Environmental Microbiology**, v.8, n.5, p.929-938, 2006.

ASHELFORD, K. E.; CHUZHANOVA, N. A.; FRY, J. C.; JONES, A. J.; WEIGHTMAN, A. J. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.12, p.7724-7736, 2005.

ASHELFORD, K. E.; CHUZHANOVA, N. A.; FRY, J. C.; JONES, A. J.; WEIGHTMAN, A. J. New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.9, p.5734-5741, 2006.

BARNS, S. M.; TAKALA, S. L.; KUSKE, C. R. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom Acidobacterium in the environment. **Applied and Environment Microbiology**, v.65, n.4, p.1731-1737, 1999.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.7, p.2647-2653, 1997.

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**, v.17, n.4, p.540-552, 2000.

COELHO, M. R.; FIDALGO, E. C. C.; ARAÚJO, F. de O.; SANTOS, H. G. dos; SANTOS, M. de L. M.; PÉREZ, D. V.; MOREIRA, F. M. S. **Solos das áreas-piloto do Projeto BiosBrasil (Conservation and Sustainable Management of Below Ground Biodiversity: Phase I), Município de Benjamim Constant, Estado do Amazonas.** Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005a. (Embrapa Solos. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento). Disponível em: <<http://www.biosbrasil.ufla.br/>>. Acesso em: 10 nov. 2006.

COELHO, M. R.; FIDALGO, E. C. C.; ARAÚJO, F. de O.; SANTOS, H. G. dos; SANTOS, M. de L. M.; PÉREZ, D. V.; MOREIRA, F. M. S. **Levantamento pedológico de uma área-piloto relacionada ao projeto BiosBrasil (Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity: Phase I), Município de Benjamim Constant (AM): Janela 6.** Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005b. (Embrapa Solos. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 68). Disponível em: <<http://www.biosbrasil.ufla.br/>>. Acesso em: 10 nov. 2006.

COLE, J. R.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S.; MVGARRELL, D. M.; BANDELA, A. M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, v.35, p.D169-D172, 2007.

EGERT, M.; FRIEDRICH, M. W. Post-amplification Klenow fragment treatment alleviates PCR bias caused by partially single-stranded amplicons. **Journal of Microbiological Methods**, v.61, p.69-75, 2005.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solos.** 2 ed. Rio de Janeiro: Embrapa-CNPS, 1997. 212p.

ERWIN, T. L. A copa da floresta tropical: o coração da diversidade biológica. In WILSON, E. O. (ed.) **Biodiversidade.** Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p. 158-165.

EWING, S.A; SUTHARD, R.J; MACALADY, J.L; HARTSHORN, A.S.; JOHNSON, M.J. Soil Microbial fingerprints, carbon, and nitrogen in a Mojave desert creosote-bush ecosystem. **Soil Science Society American Journal**, v.71, p.469-475, 2007.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.3, p.626-631, 2006.

GALLAGHER, E.; MCGUINNESS, L.; PHELPS, C.; YOUNG, L. Y.; KERKHOF, L. J. <sup>13</sup>C-carrier DNA shortens the incubation time needed to detect benzoate-utilizing denitrifying bacteria by stable-isotope probing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.9, p.5192-5196, 2005.

GAMMA, J. R. N. F.; KIEHL, J. C. Aluminum influence on plants grown in a Brazilian Red-Yellow Podzolic Soil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, n.2, p.475-582, 1999.

GENTRY, A. H. Tree species richness of Upper Amazonian Forests. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.85, n.1, p.156-159, 1988.

HARDLEY, N. F.; SZAREK, S. R. Productivity of Desert Ecosystems. **Bioscience**, v.31, n.10, p.747-753, 1981.

HEREMAN, R. P.; PROVENCIO, K. R.; HERRERA-MATOS, J.; TORREZ, R. J. Resource islands predict the distribution of heterotrophic bacteria in Chihuahuan desert soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.5, p.1816-1821, 1995.

HOUSMAN, D. C.; YEAGER, C. M.; DARBY, B. J.; SANFORD JR, R. L.; KUSKE, C. R.; NEHER, D. A.; BELNAP, J. Heterogeneity of soil nutrients and subsurface biota in a dryland ecosystem. **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p.2138-2149, 2007.

HUBER, T.; FAULKNER, G.; HUGENHOLTZ, P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. **Bioinformatics**, v.20, n.14, p.2317-2319, 2004.

JESUS, E. C. J.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Leguminosae nodulation bacteria diversity from three different land use systems in Brazilian Western Amazon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.8, p.769-776, 2005.

KIEFT, T. L.; WHITE, C. S.; LOFTIN, S. R.; AGUILAR, R.; CRAIG, J. A.; SKAAR, D. A. Temporal dynamics in soil carbon and nitrogen resources at a grassland-shrubland ecotone. **Ecology**, v.79, n.2, p.671-683, 1998.

KIM, J-S.; SPAROVEK, G.; LONGO, R. M.; MELO, W. J. de; CROWLEY, D. Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p.684-690, 2007.

KINDT, R.; COE, R. **Tree diversity analysis: a manual and software for common statistical methods and biodiversity studies**. Nairobi: World Agroforestry Centre (ICRAF), 2005. 196 p.

KINDT, R.; VAN DAMME, P.; SIMONS, A. J. Tree diversity analysis in western Kenya: using profiles to characterize richness and evenness. **Biodiversity and Conservation**, v.15, p.1253-1270, 2006.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: SATACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: Wiley, 1991. p.115-175.

LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E. D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. **Oecologia**, v.129, p.271-280, 2001.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Ecological studies in tropical fish communities**. Cambridge: Cambridge University, 1987. 390p. (Cambridge Tropical Biology Series).

LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. Global patterns in bacterial diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, n.27, p.11436-11440, 2007.

MAIDAK, B. L.; COLE, J. R.; PARKER JR, C. T.; GARRITY, G. M.; LARSEN, N.; LI, B.; LILBURN, T. G.; MCCAUGHEY, M. J.; OLSEN, G. J.; OVERBEEK, R.; PRAMANIK, S.; SCHMIDT, T. M.; TIEDJE, J. T.; WOESE, C. R. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Research**, v.27, n.1, p.171-173, 1999.

MARQUES, J. J.; TEIXEIRA, W. G.; SCHULZE, D. G.; CURI, N. Mineralogy of soils with unusually high exchangeable Al from the western Amazon Region. **Clay Minerals**, v.37, p.651-661, 2002.

MARSCHNER, P.; MARINO, W.; LIEBEREI, R. Seasonal effects on microorganisms in the rhizosphere of two tropical plants in a polyculture agroforestry system in Central Amazonia, Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p.68-71, 2002.

MARCHESI, J. R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A. J.; MARTIN, T. A.; FRY, J. C.; HIOM, S. J.; WADE, W. G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.2, p.795-799, 1998.

MARSH, T. L. Culture-independent microbial community analysis with terminal restriction fragment length polymorphism. **Methods in Enzymology**, v.397, p.308-329, 2005.

MCBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils**. New York: Oxford University, 1994. 406 p.

OKSANEN, J; KINDT, R; LEGENDRE, P.; O'HARA, R.B. **Vegan: Community Ecology Package** version 1.8-6. 2007. Disponível em: <http://cran.r-project.org/> Acesso em: 15 dez. 2007.

OSBORN, A. M.; MOORE, E. R. B.; TIMMIS, K. N. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. **Environmental Microbiology**, v.2, n.1, p.29-50, 2000.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna, Áustria: R Foundation for Statistical Computing, 2007. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 15 dez. 2007.

BROWN, J. R. **Recommended chemical soil test procedures for the North Central Region**. North Carolina: North Central Regional Research, 1998. n.221.

RICKLEFS, R. E. **A economia da natureza: um livro-texto em ecologia básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 470 p.

ROSSELLÓ-MORA; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.39-67, 2001.

SAIT, M.; DAVIS, K. E. R.; JANSSEN, P. H. Effects of pH on isolation and distribution of members of the subdivision 1 of the phylum *Acidobacteria* occurring in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.3, p.1852-1857, 2006.

SCHLESINGER, W. H.; PILMANIS, A. M. Plant-soil interactions in deserts. **Biogeochemistry**, v.42, n.1/2, p.169-187, 1998.

SCHLESINGER, W. H.; RAIKES, J. A.; HARTLEY, A. E.; CROSS, A. F. On the spatial pattern of soil nutrients in desert ecosystems. **Ecology**, v.77, n.2, p.364-374, 1996.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.3, p.1501-1506, 2005.

SMITH, C. J.; DANILOWICZ, B. S.; CLEAR, A. K.; COSTELLO, F. J.; WILSON, B.; MEIJER, W. G. T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, p.375-380, 2005.

SWOFFORD, D. L. **PAUP\***: phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2000.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.

TIEDJE, J. M.; ASUMING-BREMPOG, S.; NÜSSLEIN, K.; MARSH, T. L.; FLYNN, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, v.13, p.109-122, 1999.

TÓTHMÉRÉSZ, B. Comparison of different methods for diversity ordering. **Journal of Vegetation Science**, v.6, p.283-290, 1995.

YIN, B.; CROWLEY, D.; SPAROVEK, G.; MELO, W. J. de; BORNEMAN, J. Bacterial functional redundancy along a soil reclamation gradient. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.10, p.4361-4365, 2000.





## CHAPTER 5

### CONCLUDING REMARKS

We summarize in this chapter some of the main findings and general conclusions of our work and present answers for the hypotheses presented in the first chapter.

Our data shows that Amazonian soil bacterial communities differed in structure and that those differences are mainly related to changes in the soil attributes, which are clearly affected by land use. Correlation with attributes related to soil acidity and nutrient concentration were the most significant. These soil attributes are directly affected by land use in slash-and-burn agriculture as previously discussed. Contrary to what was observed for soil attributes, geographic distance itself was not significant. It was significant when in interaction with land use. This interaction was interpreted as a result of the non random distribution of land use systems in the studied area. Thus, *we conclude that land use indirectly affects community structure by means of changes in the soil attributes*. This refutes the first two hypotheses which say that bacterial community structure does not change as a result of land use and that community structure is not affected by changes in the soil attributes, and supports the hypothesis that geographic distance does not affect community structure.

Differences in diversity were found between Amazonian communities, but we did not observe a clear pattern of diversity variation with land use and changes in the soil attributes, except that diversity was consistently higher in the Pasture. Thus, we can reject the hypothesis which says that diversity is the same in all land use systems. *We conclude that the Pasture is the most diverse of the studied land use systems in the Western Amazon*. If we consider the Pasture as the most impacted system compared to the Forest, we can reject the hypothesis

that land use intensification decreases bacterial diversity. Moreover, the bacterial community from one of the cultivated samples was more diverse than communities from soils under Forest.

Clear differences in bacterial community structure are observed when communities from soils of the United States are included in the analysis. These differences are significantly correlated to differences in the soil attributes. The placement of bacterial communities from Michigan closer to Amazonian bacterial communities in the ordination graphic indicates that geographic distance is not an important factor, since Michigan is more distant from Amazon than Sevilleta (NM) and the Great Basin Experimental Range (UT). The hypotheses saying that community structure is the same in soils from Amazon, Michigan, Sevilleta (NM) and great Basin Experimental Range (UT) and that differences in community structure are not correlated to differences in the soil attributes are rejected. Thus, *we conclude that differences in bacterial community structure are related to differences in the soil attributes.*

Diversity in Sevilleta soils did not differ from diversity in Pasture soils of the Western Amazon and a clear pattern of variation with soil attributes was not observed. Although diversity in one of the Sevilleta communities was higher than diversity in Forest communities of the Amazon, one community of forest and other from Sevilleta could not be ranked, indicating that bacterial communities with similar diversity can be found in soils under natural vegetation from desert and tropical forest environments. *We conclude that bacterial communities as diverse as those found in Sevilleta soils can be found in the Amazon.*

Summarizing our conclusions:

1. Changes in the soil attributes are related to land use;

2. Differences in the structure of the studied bacterial communities are related to changes in the soil attributes, especially those linked to soil acidity and nutrient concentration, and more similar communities are present in soils with more similar attributes;
3. Soil attributes accounted for 31% of the variation in the studied bacterial communities;
4. The effect of land use on the bacterial communities was indirect, through changes in the soil attributes;
5. Clear differences in composition can be observed among bacterial communities and these differences are linked to land use;
6. Bacterial communities from Pasture soils are the most diverse among the studied bacterial communities;
7. Differences in the structure of soil bacterial communities from Amazon, Michigan, Sevilleta (NM) and Great Basin Experimental Range (UT) are related to differences in the soil attributes and more similar communities are present in soils with more similar soil attributes, independently of geographic distance;
8. Bacterial communities from soils of Sevilleta (NM) are as diverse as bacterial communities from Pasture soils of the Western Amazon;
9. Bacterial communities as diverse as those found in Sevilleta (NM) can be found in the acid and Al rich Amazonian soils that we studied.



## ANNEXES

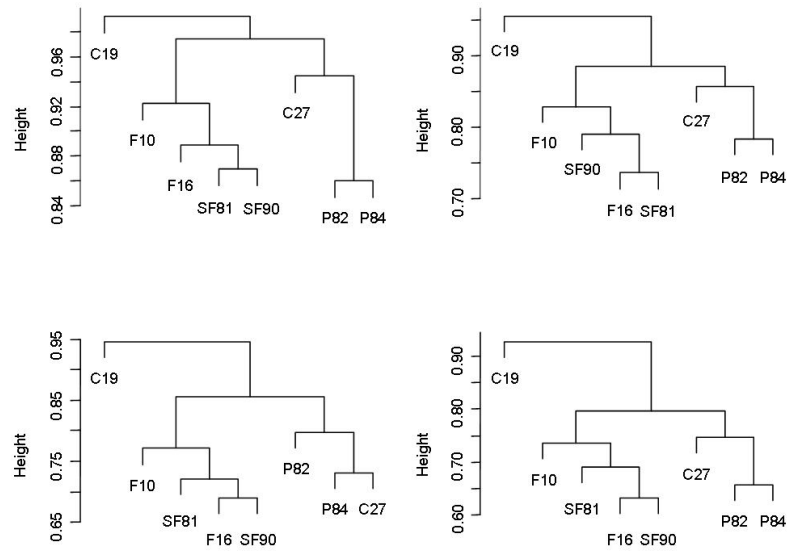


FIGURE A1 Dendrogram based on the structure of soil bacterial communities considering the cut-offs of 100%, 99%, 98% and 97% of similarity for OTU definition. The Bray-Curtis distance and the average linkage algorithm were used. C, crops; F, forest; P, pasture; SF, old secondary forest.

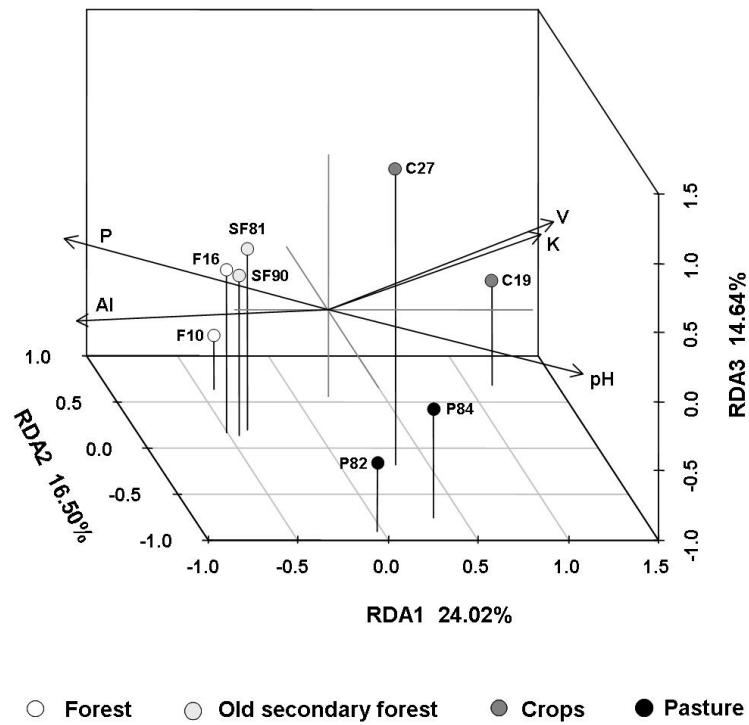


FIGURE A2 Redundancy Analysis for soil bacterial communities under different land use systems in the Western Amazon. The cut-off of 97% of similarity was considered for OTU definition. Each vector points to the direction of increase for a given variable and its length indicates the strength of the correlation between this variable and the ordination scores.

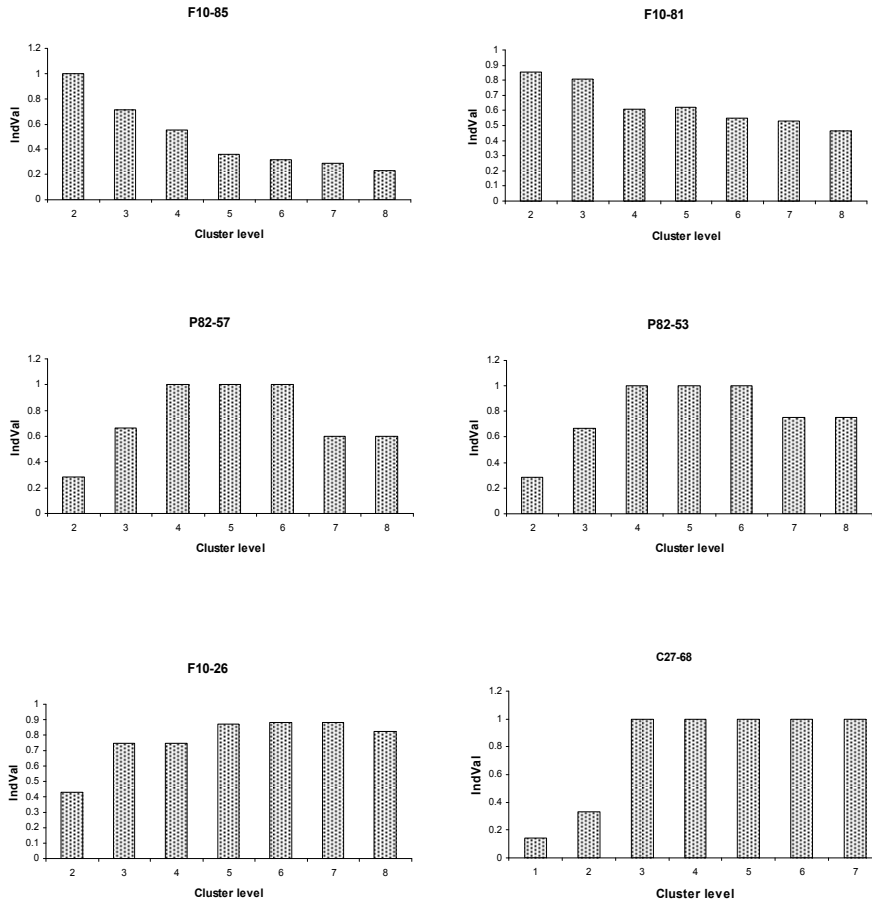


FIGURE A3 Plots of the indicator values obtained at each level of the hierarchical clustering analysis performed with sequencing data. Graphics at the top were built for representatives of higher hierarchic levels, as indicated by the decrease in the indicator value as the sites are split among different groups; graphics at the middle were built for representatives of intermediate hierarchic levels; and graphics at the bottom were built for representatives of specific sites, such as the C27-68, which was detected on sample C27 only.

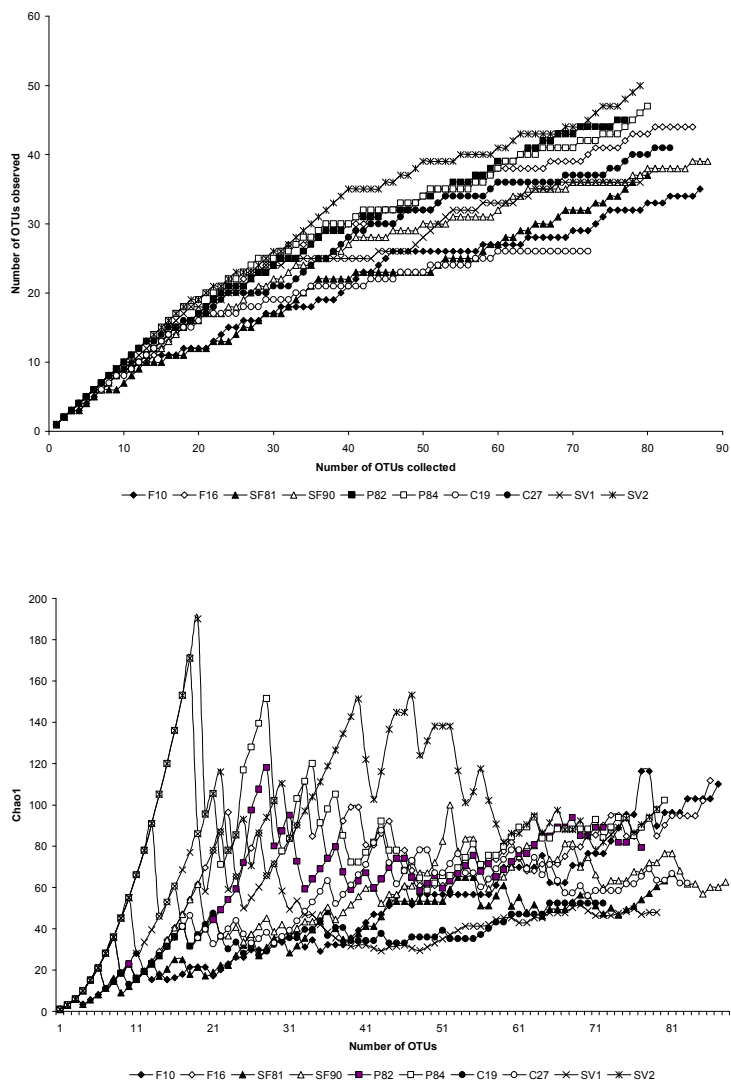


FIGURE A4 Accumulation curves built by using the number of OTUs and Chao1 estimator curves for soil bacterial communities under different land use systems in the Western Amazon. The cut-off of 97% of similarity was considered for OTU definition.



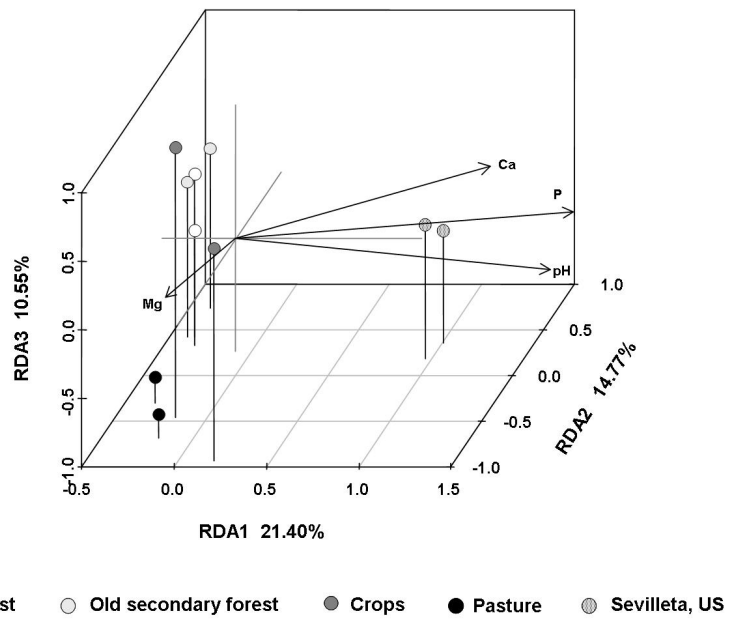


FIGURE A5 Redundancy analysis ordination of soil bacterial communities considering the cut-off of 97% of similarity for OTU definition.

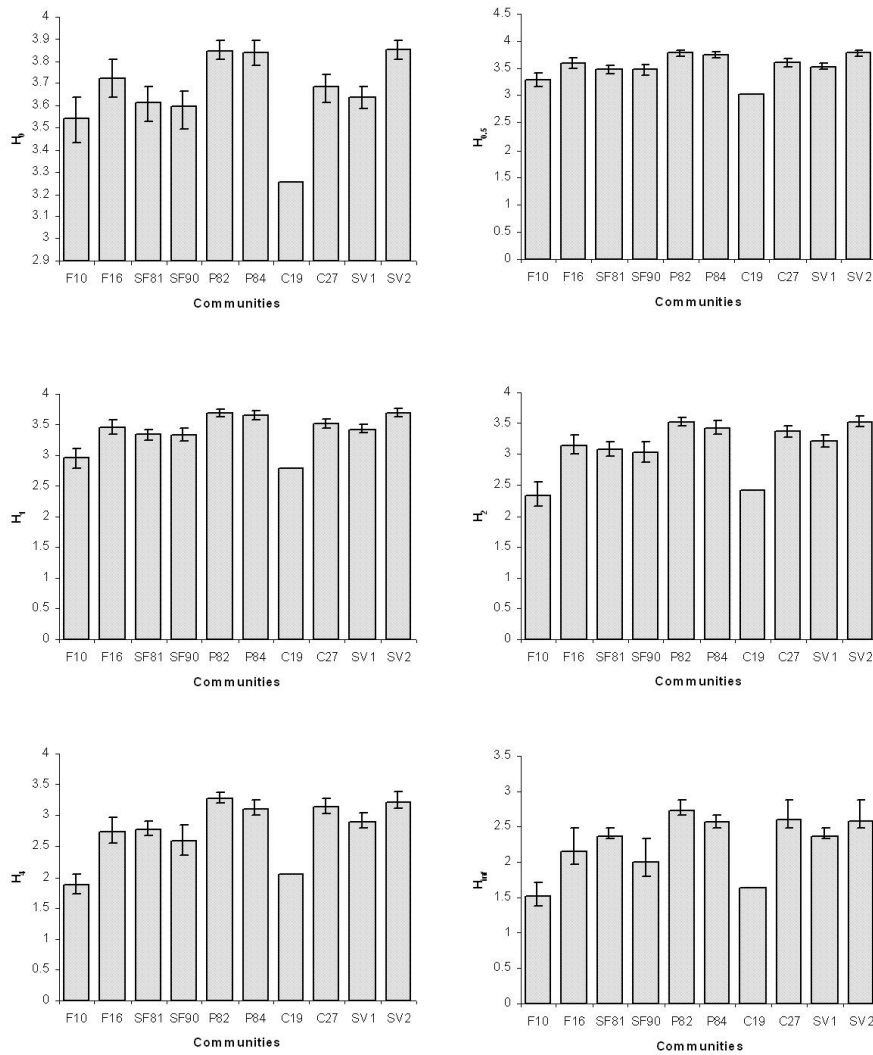


FIGURE A6 Values of the generalized entropy formula of Renyi and their respective confidence intervals calculated with different values of  $\alpha$  for soil bacterial communities, considering the cut-off of 97% of similarity for OTU definition. The values 0, 1, 2 and inf in the x axis refer to the species richness and Shannon, Simpson and Berger-Parker diversity indices, respectively. Communities were rarefied (1000 permutations) and the confidence intervals are presented as the 2.5% and 97.5% percentile values obtained during permutations.

TABLE A1 Seqmatch and classifier results for indicator sequences of soil bacterial communities from different land use systems of the Western Amazon.

Codes	Closest match	Accession no.	Classifier results	
			Phylum	Deepest classification
F16-2	Arthrobacter sp. LC6	AB248527	Actinobacteria	Arthrobacter
F16-26	Uncultured soil bacterium 26_c	DQ303977	Acidobacteria	Gp1
P82-16	Uncultured bacterium BFA_072	EF443776	Alphaproteobacteria	Sphingomonadaceae
P82-57	Uncultured Bacteroidetes bacterium DGGE gel band ESR BR 4	AF540039	Bacteroidetes	Sphingobacteriales
P82-21	Uncultured Firmicutes bacterium GASP-WC2S2_B11	EF074978	Acidobacteria	Gp3
P82-33	Uncultured bacterium JH-WH372	EF492912	Acidobacteria	Gp1
P82-70	Uncultured Acidobacteriales bacterium GASP-WB1S2_C06	EF073400	Acidobacteria	Gp1
P84-30	Uncultured Acidobacteriaceae bacterium GASP-WA1S1_B02	EF072020	Acidobacteria	Gp1
C19-69	Uncultured Pedomicrobium sp. GASP-MB3W3_H06	EF666045	Alphaproteobacteria	Pedomicrobium
C19-70	Uncultured Acidobacteria bacterium GASP-MA4S3_G11	EF664092	Acidobacteria	Gp6
C19-68	Uncultured bacterium FFCH6201	EU133143	Actinobacteria	Actinobacteria
C19-24	Uncultured bacterium B1_35R	AM157279	Alphaproteobacteria	Phenylobacterium
F10-31	Bradyrhizobium sp. HTCC381	AY429691	Alphaproteobacteria	Bradyrhizobiaceae
F10-85	Uncultured soil bacterium 4S2_G10	EU052114	Acidobacteria	Gp3
F10-27	Uncultured soil bacterium 17_c	DQ303980	Acidobacteria	Gp1
F10-81	Uncultured bacterium NAT70	AJ607025	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria
F10-57	Uncultured Rhodoplanes sp. GASP-WB1W3_E07	EF073782	Alphaproteobacteria	Rhodoplanes
F10-26	Uncultured Burkholderia sp. SSCP Band 18	AM267497	Betaproteobacteria	Burkholderia
C27-51	Uncultured gamma proteobacterium GASP-WA1S1_C11	EF072039	Proteobacteria	Proteobacteria
C27-78	Uncultured soil bacterium 597-1	AY326608	Alphaproteobacteria	Rhizobiales
C27-33	rhizosphere soil bacterium RSI-35	AJ252602	Bacteroidetes	Sphingobacteriaceae

Continua...

TABELA S1, cont.

C27-28	Uncultured Sphingobacteriales bacterium LEO_08	EU158813	Bacteroidetes	Sphingobacteriales
C27-36	Uncultured Burkholderia sp. JAB SL 130	EF512145	Acidobacteria	Gp1
C27-16	Uncultured Rhizobiales bacterium GASP-WDOS3_D03	EF075635	Alphaproteobacteria	Rhodomicrobium
C27-57	Uncultured bacterium FFCH6369	EU133689	Bacteroidetes	Sphingobacteriales
C27-59	Uncultured bacterium 27RHU42	AJ863336	Betaproteobacteria	Herbaspirillum
C27-22	Uncultured bacterium E006A11.x0	EF430542	Acidobacteria	Gp4
C27-3	Uncultured Acidobacteria bacterium GASP-WB2W2_A02	EF074163	Acidobacteria	Gp1
C27-39	Pseudomonas sp. WAB1930	AM184269	Gammaproteobacteria	Pseudomonas
C27-5	Uncultured alpha proteobacterium GASP-WC2W3_E09	EF075375	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales
C27-35	Uncultured Acidobacteria bacterium GASP-WB2W1_E07	EF074134	Acidobacteria	Gp6
C27-14	Uncultured alpha proteobacterium GASP-WB1W1_H09	EF073551	Alphaproteobacteria	Rhizobiales
C27-68	Uncultured gamma proteobacterium GASP-MA2W2_C04	EF663212	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria
C27-55	Uncultured Sphingobacteria bacterium GASP-WA1W1_E09	EF072325	Bacteroidetes	Pedobacter
C27-41	Uncultured bacterium N9	AY827059	Thermomicrobia	Thermomicrobium
C27-10	Uncultured bacterium AG1_H06	DQ829813	Acidobacteria	Gp1
C27-71	Uncultured Acidobacteria bacterium GASP-WC1W2_A06	EF074712	Acidobacteria	Gp1
C27-47	Bacterium Ellin6074 BF0001B010	AY234726	Acidobacteria	Gp1
C27-62	Uncultured bacterium	AM696984	Betaproteobacteria	Massilia
C27-40	Uncultured bacterium 1700a2-04	AY917287	Actinobacteria	Micromonosporaceae
C27-52	Uncultured bacterium AG2_B09	DQ829854	Acidobacteria	Gp1