



**VANESSA ALVARENGA MESQUITA**

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE  
MICROBIOLÓGICA DE SOLO DO CERRADO  
DE MINAS GERAIS POR ELETROFORESE EM  
GEL DE GRADIENTE DESNATURANTE  
(DGGE)**

**LAVRAS - MG**

**2011**

**VANESSA ALVARENGA MESQUITA**

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA DE  
SOLO DO CERRADO DE MINAS GERAIS POR ELETROFORESE EM  
GEL DE GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Genética de Microrganismos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

Coorientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

**LAVRAS – MG**

**2011**

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

Mesquita, Vanessa Alvarenga.

Caracterização da diversidade microbológica de solo do Cerrado de Minas Gerais por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) / Vanessa Alvarenga Mesquita. – Lavras : UFLA, 2011.

70 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Cristina Ferreira Silva e Batista.

Bibliografia.

1. Cerrado. 2. PCR-DDGE. 3. Diversidade. 4. Microrganismos do solo. 5. Técnicas moleculares. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.46

**VANESSA ALVARENGA MESQUITA**

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA DE  
SOLO DO CERRADO DE MINAS GERAIS POR ELETROFORESE EM  
GEL DE GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Genética de Microrganismos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de fevereiro de 2011.

Dr. Disney Ribeiro Dias                      UFLA

Dra. Rosane Freitas Schwan                      UFLA

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2011**

*A minha mãe, Dilza,  
pelas orações e conselhos.  
A meu pai, Luiz, pela criação.  
Aos meus familiares e amigos, pelo carinho.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

A professora Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista, pela orientação deste trabalho e por ter confiado em mim. Por ter me proporcionado tão valiosas experiências, que levarei por toda a vida. Agradeço pela paciência e dedicação na orientação, pela amizade, pela responsabilidade em transmitir conhecimentos e pelo exemplo de conduta como pesquisadora e professora.

A professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pela co-orientação, paciência, conselhos, pelos conhecimentos repassados, exemplo de pesquisadora e de humanidade.

Ao professor Dr. Romildo da Silva, pelos ensinamentos transmitidos, atenção, brincadeiras.

Ao professor Dr. Eustáquio Souza Dias, pelos ensinamentos transmitidos, pela atenção e dedicação como educador.

A Dra. Carla Luiza da Silva Ávila e ao professor Dr. Disney Ribeiro Dias, pelos ensinamentos transmitidos, pela atenção e pela participação na banca avaliadora.

A Dra. Karina Teixeira Magalhães e a Ms. Cíntia Lacerda Ramos pela participação direta na concretização deste trabalho em todas as etapas, amizade, pelo carinho e conselhos.

As amigas do Departamento de Ciência do solo Dra. Fernanda e Ms. Amanda pela ajuda e conselhos. Aos amigos de árdua coleta Dr. Euziclei, Emerson, Angélica, Fernanda, Monique, Martín, Mariana, Kelly, Alenir e Dra. Ligiane.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia da UFLA, pela amizade.

A todos os meus amigos, colegas e companheiros de laboratório e mestrado. Não citarei nomes, pois não quero cometer o erro de esquecer alguém. Assim, agradeço a todos, e saibam que cada um tem grande importância em minha vida.

Finalmente, agradeço aos meus pais, Luiz e Dilza e irmão Vinícius, que sempre acreditaram e apoiaram minhas decisões e estiveram presentes em todos os momentos difíceis desta jornada.

## RESUMO

O Cerrado é considerado o segundo maior bioma do país em área. Dentre os estados que fazem parte deste bioma Cerrado, o estado de Minas Gerais possui 57% de Cerrado sendo caracterizados por solos com alta acidez, baixa fertilidade, níveis elevados de ferro e alumínio. Há poucos estudos sobre a diversidade microbiana dos solos do Cerrado. A aplicação de técnicas moleculares vem sendo frequentemente empregada para detectar e identificar os microrganismos em ambientes naturais. Neste estudo, a comunidade microbiana presente no solo do Cerrado conservado de diferentes locais de Minas Gerais, foi investigada por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), seguido de seqüenciamento. Quinze amostras compostas foram coletadas na estação seca e quinze na estação chuvosa nas regiões de Arcos, Passos e Luminárias. A técnica PCR-DGGE foi satisfatória para detectar as comunidades no solo. Para bactéria os gêneros encontrados foram *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Escherichia* e *Leuconostoc*. Para a comunidade fúngica foram encontrados os gêneros *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Lachancea* e *Cladosporium*. Foi possível verificar diferença entre as comunidades de acordo com a região de amplificação do gene quando se utilizou diferentes primers, possibilitando uma maior representatividade das comunidades microbianas. Os parâmetros físico-químicos não foram influentes na microbiota demonstrando que os microrganismos *Zygosaccharomyces* sp., *Candida* sp., *Lachancea meyersii*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cowanii*, *Klebsiella pneumoniae* foram dominante nos solos do Cerrado mineiro. Nossos resultados são relevantes para o conhecimento da comunidade microbiana dos solos do Cerrado, porém mais estudos se fazem necessários para maior compreensão desta comunidade e o seu papel no solo.

Palavras-chave: Cerrado. PCR-DGGE. Diversidade.



## ABSTRACT

The Cerrado is the country's second largest biome in the area. Among the states that are part of this biome, Minas Gerais has 57% of Cerrado presenting a soil with high acidity, low fertility and with high levels of iron and aluminum. There are only a few studies on microbial diversity in Cerrado's soil. The use of molecular techniques has frequently been employed to detect and identify microorganisms in natural environments. In this study, the microbial community present in Cerrado soil kept in different places of Minas Gerais was investigated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), followed by sequencing. Fifteen composite samples were collected during the dry season and fifteen in rainy seasons in regions of the Arcos, Passos and Luminárias. The PCR-DGGE technique was effective in detecting communities in the soil. In the bacteria genera, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Escherichia*, and *Leuconostoc* were found. In the fungal community, the genera *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Cladosporium*, and *Lachancea* were found. It was possible to verify difference between the communities according to the region of gene amplification, when using different primers, allowing greater representativeness in the community. The physicochemical parameters were not influential in the environment showing that the microorganisms *Zygosaccharomyces* sp., *Candida* sp., *Lachancea meyersii*, *Enterobacter cowanii*, *Klebsiella pneumoniae* were dominant in the Minas Gerais' Cerrado. Our results are relevant for a better understanding of the microbial community in Cerrado Soil, but more studies are necessary to provide better knowledge of this community and its effect on soil.

Keywords: Cerrado. PCR-DGGE. Diversity.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	10
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>O Cerrado</b> .....	12
<b>2.2</b>	<b>Comunidade microbiana no solo</b> .....	14
<b>2.3</b>	<b>Microrganismos</b> .....	17
<b>2.3.1</b>	<b>Bactérias</b> .....	17
<b>2.3.2</b>	<b>Bactérias fixadoras de nitrogênio</b> .....	18
<b>2.3.3</b>	<b>Actinobactérias</b> .....	20
<b>2.3.4</b>	<b>Fungos filamentosos</b> .....	21
<b>2.3.5</b>	<b>Leveduras</b> .....	23
<b>2.4</b>	<b>Ferramentas para avaliação da diversidade microbiana do solo</b> .....	24
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30
	<b>CAPÍTULO 2 Perfil da comunidade microbiana presente no solo de cerrado brasileiro em três diferentes regiões do estado de Minas Gerais</b> .....	37
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	39
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
<b>2.1</b>	<b>Descrições do local e amostragem do solo</b> .....	41
<b>2.2</b>	<b>Extração do DNA e análise de PCR-DGGE</b> .....	41
<b>2.3</b>	<b>Sequenciamento das bandas de DGGE</b> .....	42
<b>2.4</b>	<b>Análise físico-química do solo do Cerrado mineiro</b> .....	45
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>3.1</b>	<b>Identificação e avaliação dos diferentes primers utilizados nas comunidades de bactérias e fungos no solo do Cerrado mineiro</b> .....	46
<b>3.2</b>	<b>Análise da diversidade da comunidade do solo do Cerrado de Minas Gerais</b> .....	54
<b>3.3</b>	<b>Propriedades físico-químicas das amostras de solo do Cerrado mineiro</b> .....	60
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	65
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	66

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

As savanas são formações tropicais e subtropicais, caracterizadas por uma camada contínua de grama, apenas interrompida por arbustos e árvores em proporções variáveis, em que os principais padrões de crescimento estão intimamente associados à alternância das estações secas e úmidas. O Cerrado brasileiro é a principal região de savana na América e distendem-se por aproximadamente dois milhões de km<sup>2</sup>, principalmente no planalto central do Brasil, sob um clima sazonal de verões úmidos e invernos secos.

Poucos estudos se têm sobre a diversidade biológica do Cerrado, no entanto as áreas nativas vêm sofrendo intensas mudanças com o uso da terra, em especial devido ao desenvolvimento agrário. A conversão de áreas nativas em áreas de pastagens pode estar impactando as comunidades microbianas deste bioma.

Segundo a Conservação Internacional do Brasil - CIB (2010), o Cerrado é um dos 17 ecossistemas mais degradados do planeta, precisando de medidas que compatibilizem o desenvolvimento com a manutenção da sua biodiversidade. Cerca de 80% do Cerrado já foi modificado pelo homem e somente 19% corresponde a áreas-fragmento nas quais a vegetação original ainda se encontra pouco modificada.

O Estado de Minas Gerais, preocupado com a preservação deste bioma, desenvolveu o projeto BIOTA – MINAS, visando o conhecimento da biodiversidade do Estado de Minas Gerais desenvolvendo um mapeamento da fauna, flora e microrganismos mineiros.

A microbiota do solo é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia dentro do

solo, exercendo influência tanto na transformação da matéria orgânica quanto na estocagem do carbono e nutrientes.

A aplicação de técnicas moleculares em estudos de ecologia microbiana tem sido frequentemente utilizado para explorar a diversidade microbiana e analisar a estrutura das comunidades existentes. As abordagens moleculares independente de cultura provaram ser ferramentas poderosas na criação de um inventário mais completo da diversidade microbiana em amostras ambientais e PCR-DGGE tem sido aplicada com êxito para avaliar a microbiota do solo. A avaliação da diversidade em solo de Cerrado é um aspecto importante na busca da manutenção da biodiversidade deste solo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O Cerrado

O bioma Cerrado (savana tropical) é o segundo maior bioma da América do Sul, com grande biodiversidade e espécies endêmicas. Caracteriza-se por verões quentes e chuvosos (22 de Setembro a 20 de Março) e invernos suaves e secos (21 de Março a 21 de Setembro). A precipitação média anual é de 1.500 mm, as temperaturas são geralmente amenas ao longo do ano, entre 22°C e 27°C em média, e a radiação solar de aproximadamente 500 Cal cm<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup> (PEIXOTO et al., 2010).

O termo Cerrado é comumente utilizado para designar o conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campos e matas de galeria) que ocorrem no Brasil Central. Caracteriza-se pela existência de um extrato herbáceo (gramíneas), e um extrato arbóreo/arbustivo. A vegetação pode ser descrita, em termos gerais, como savana entremeada de Matas Ciliares. No conjunto de paisagens, são consideradas como as mais comuns: o Campo Limpo, o Campo Sujo (formações campestres), o Cerrado, o Cerradão (formações florestais) e as Matas de Galeria (KLINK; MACHADO, 2005).

O Cerrado apresenta uma extensão de aproximadamente 207 milhões de hectares, englobando o Estado de Goiás, o Distrito Federal e parte dos Estados da Bahia, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, Rondônia e Tocantins (Figura 1) (GUCKER; BOECHAT; GIANI, 2009).

Os solos do Cerrado apresentam características químicas comuns como elevada acidez, toxidade de alumínio, alta deficiência de nutrientes e alta capacidade de fixação de fósforo (GUCKER; BOECHAT; GIANI, 2009). Este bioma é composto por tipologias vegetacionais adaptadas aos solos com altos

teores de alumínio e distróficos, predominando as classes Cambissolos, Latossolos, Neossolos Quartzarênicos.

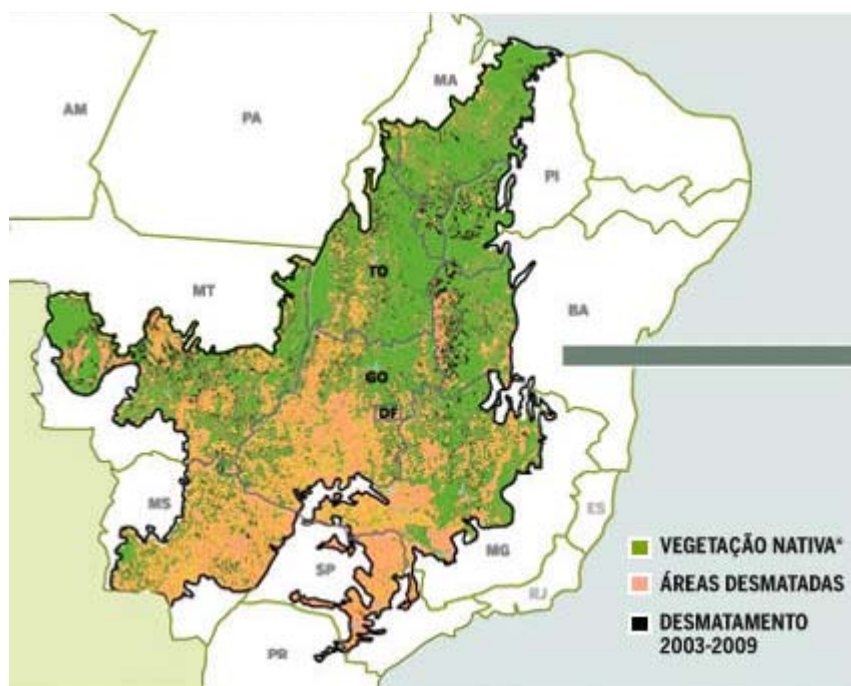


Figura 1 Localização do bioma Cerrado no Estado de Goiás, Distrito Federal e parte dos Estados da Bahia, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, Rondônia e Tocantins

Fonte: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (2010)

A excelente estrutura física desses solos, juntamente com os avanços tecnológicos na agricultura durante os últimos 30 anos, fez com que o Cerrado atingisse a liderança na produção agrícola do Brasil, ocorrendo uma grande conversão desse bioma em pastagens e campos agrícolas (PEIXOTO et al., 2010). O Cerrado, como o bioma Mata Atlântica, é um hotspot de biodiversidade no Brasil (BERNARDES; SANTOS, 2006). Além da grande importância ecológica e econômica, pouco se sabe sobre a biodiversidade do

Cerrado, especialmente a diversidade microbiana do solo (CASTRO et al., 2008).

## **2.2 Comunidade microbiana no solo**

Os microrganismos realizam atividades imprescindíveis para manutenção e sobrevivência das comunidades vegetais e animais. No solo as principais atividades dos organismos são decomposição da matéria orgânica, produção de húmus, ciclagem de nutrientes e energia (incluindo a fixação de nitrogênio atmosférico), produção de compostos complexos que contribuem para a agregação do solo, decomposição de xenobióticos e controle biológico de pragas e doenças (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A diversidade de microrganismos é tão vasta quanto desconhecida (STURSA et al., 2009). Um grama de solo pode conter 10 bilhões de microrganismos, representando milhares de espécies. O número de espécies microbianas identificadas cresce a cada ano, sendo descritos mais de 70.000 fungos, 30.000 protozoários, 26.000 algas, 6.500 bactérias e 1.000 vírus. Esses números são, no entanto, pequenos diante do total de espécies, estimado em cerca de dois milhões. Isso significa que foram descobertas e nomeadas até o presente momento, talvez, menos de 0,1% e no máximo 10% das espécies microbianas, dependendo do hábitat estudado (ROSSELÓ-MORA; AMMAN, 2001; STURSA et al., 2009).

Melloni et al. (2001) avaliando as características biológicas de solos sob mata ciliar e campo do Cerrado observaram que o número médio de propágulos viáveis por grama de solo seco situou-se de  $10^6$  a  $10^7$  para bactérias,  $10^5$  para fungos e amonificadores,  $10^4$  a  $10^5$  para microrganismos solubilizadores de fosfato e  $10^6$  para celulolíticos. Verificou-se uma tendência generalizada da

comunidade microbiana ser maior no ecossistema de mata em relação ao de campo.

A comunidade microbiana nos solos é influenciada pelo ambiente. As modificações ambientais ao longo das estações do ano podem influenciar as populações na comunidade microbiana. Tais variações estão diretamente ligadas ao regime hídrico e ao clima da região, à estrutura e ao manejo do solo, e ao teor e à qualidade dos resíduos vegetais aportados (CASTRO et al., 2008). Um solo com teor elevado de matéria orgânica tende a manter a população microbiana mais estável ao longo do ano, provavelmente, em decorrência da riqueza de nichos ecológicos e pela heterogeneidade das fontes de carbono (FEDE; PANACCIONE; SEXTONE, 2001; TOLEDO et al., 2009).

A distribuição e especificidade das comunidades de microrganismos também estão relacionadas com a composição de nutrientes presentes no substrato, a presença de compostos inibitórios, e os vetores que utilizam estes substratos para reprodução e alimentação (PIMENTA et al., 2009).

Nos ecossistemas naturais, a cobertura vegetal permanente proporciona proteção contínua do solo, além de adicionar grandes quantidades de nutrientes principalmente através de resíduos. Seus efeitos sobre a comunidade microbiana podem interagir com os efeitos provocados pelas flutuações hídricas e térmicas que ocorrem durante o ano. Isso pode influenciar em menor ou maior grau as populações microbianas, através da determinação da atividade e das taxas de crescimento das diversas populações na comunidade microbiana (CASTRO et al., 2008; PEREIRA; NEVES; DROZDOWICZ, 1999).

A manutenção da biodiversidade do bioma Cerrado depende da relação entre o homem e o ambiente, pois a expansão agropecuária fez deste bioma uma das principais regiões de produção do país, com implantação de culturas importantes para o agronegócio, como soja, bovinocultura de corte e eucalipto (TOLEDO et al., 2009). Estas práticas agrícolas alteram as características



físicas, químicas e biológicas determinantes das condições de solo, influenciando as diversas populações na comunidade microbiana. Essas modificações refletem-se na composição, atividade e biomassa desta comunidade, uma vez que a permanência de uma população no ecossistema fica condicionada à sua habilidade de adaptação e de resposta a essas mudanças ambientais (BERNARDES; SANTOS, 2006).

As modificações no equilíbrio estabelecido entre as populações microbianas ocorrem principalmente em decorrência de alterações de pH, umidade, aeração, temperatura e disponibilidade de nutrientes orgânicos e inorgânicos, pelo efeito isolado ou do somatório de dois ou mais desses fatores (BERNARDES; SANTOS, 2006).

Os microrganismos do solo podem ser classificados em grupos funcionais de acordo com suas atuações nos processos biológicos do ecossistema. Exemplos desses grupos são os microrganismos envolvidos no ciclo do nitrogênio (diazotróficos, desnitrificadores, amonificadores) e os envolvidos no ciclo do carbono, desde os degradadores de polímeros complexos, até arqueas, incluindo metanogênicas e metanotróficas (CHAER et al., 2009; PEIXOTO et al., 2010; TORSVIK; OVREAS, 2002).

Os organismos do solo, tais como fungos, bactérias e actinobactérias são ditos como biota do solo, possuem características genéticas e fenotípicas que demonstram a sua capacidade de viver nestes locais assim como sua influência nos mesmos. Esses microrganismos apresentam alta diversidade metabólica e fisiológica, tornando-os versáteis no habitat dos vários nichos ecológicos, como é o caso dos nichos do Cerrado. Podem ser classificados em autotróficos ou heterotróficos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O isolamento e a identificação de microrganismos a partir de fontes naturais tem sido uma ferramenta amplamente utilizada para a obtenção de estirpes úteis e geneticamente estáveis (ADNAN; TAN, 2007). O estudo da

diversidade de microrganismos do Cerrado pode desvendar o efeito da perturbação no ecossistema, pode descobrir novos táxons com potencial para aplicações biotecnológicas e principalmente analisar a diversidade microbiana nestes ecossistemas. Analisar as comunidades obtidas em diferentes locais é importante para compreender a distribuição das comunidades nestes ecossistemas (PIMENTA et al., 2009).

## **2.3 Microrganismos**

Os microrganismos mais comumente encontrados nos solos do Cerrado mineiro são bactérias, bactérias fixadoras de nitrogênio, actinobactéria, fungos filamentosos e leveduras.

### **2.3.1 Bactérias**

O número de bactérias normalmente é maior que os fungos e actinobactérias do solo, representando entre 25 e 30% de biomassa microbiana (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A população destes grupos é maior na superfície do solo declinando com a profundidade. Os microrganismos que vivem na superfície do solo são os mais envolvidos na formação do solo, no ciclo biogeoquímico dos nutrientes e na regulação do fluxo da água. Assim, a microbiota presente na superfície do solo é responsável pelo funcionamento ecológico, possuindo um importante papel nas atividades de decomposição e transformação de nutrientes (GOBERNA et al., 2005).

Caracterização detalhada da biodiversidade no bioma Cerrado ainda não é bem compreendida, pouco se sabe sobre suas comunidades bacterianas do solo. Alguns estudos descreveram o isolamento de novas espécies de bactérias do solo de Cerrado (BARROS et al., 2003). *Streptomyces* isoladas do solo,

principalmente do Cerrado, estão sendo empregadas na biotecnologia e estudos demonstram que um grupo específico destas bactérias pode ser influenciado por estímulos ambientais (GOMES et al., 2001).

De acordo com Uroz et al. (2009), a formação dos minerais desempenha um papel fundamental no ambiente, influenciando na biodisponibilidade de elementos químicos que podem ser benéficas ou tóxicas para a vida de outros organismos. A utilização futura de bactérias degradadoras de minerais podem substituir a adubação química e estes microrganismos são capazes de promover o crescimento de plantas através da liberação de nutrientes presos nestes minerais (UROZ et al., 2009).

Estudos sobre a degradação microbiana são úteis no desenvolvimento de estratégias de biorremediação para a desintoxicação de inseticidas por microrganismos. A degradação microbiana é considerada um importante fator que determina o destino dos pesticidas e inseticidas organofosforados presentes no ambiente Cerrado (CYCON; WOJCIK; PIOTROWSKA-SEGET, 2009). Sorensen, Albers e Aamand (2008) indicaram que as cepas de bactérias têm um grande potencial de degradação dos inseticidas organofosforados e outros pesticidas.

Pereira et al. (2006) usaram a técnica de 16S rRNA para caracterizar a microbiota de diferentes solos utilizados em plantações e floresta modificada em Guaíra, Estado de São Paulo, Brasil; e observaram a presença dos filos Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Archaea, além de outras não identificadas.

### **2.3.2 Bactérias fixadoras de nitrogênio**

A maioria dos eucariotos (plantas e animais) não consegue utilizar o  $N_2$  abundante na atmosfera terrestre. Alguns organismos incluídos no grupo dos

eucariotos conseguem converter ou reduzir este nitrogênio em amônia, o qual pode ser incorporado ao crescimento e manutenção das células destes eucariotos. Estes organismos são denominados diazotróficos e o mecanismo responsável pela incorporação de  $N_2$  à biomassa é chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Tem sido demonstrado que as bactérias diazotróficas não só são capazes de fixar nitrogênio atmosférico, mas também produzem metabólitos de interesse agrícola, incluindo fitormônios regulando o crescimento das plantas (ROESCH et al., 2007).

Em geral, já foram descritas espécies representantes de vários grupos de procariotos que fixam nitrogênio, tais como: bactérias fotossintetizantes (ex.: *Rhodospirillum rubrum*), bactérias anaeróbicas (ex.: *Clostridium* spp.), microaerófilas (ex.: *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Acetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azoarcus* spp., *Burkholderia* spp., etc.), bactérias aeróbicas (ex.: *Azotobacter* spp. e *Dexia* spp.) e também alguns representantes das cianobactérias e actinobactérias (*Frankia*) (HAYAT et al., 2010; SPRENT; SPRENT, 1990).

Bactérias fixadoras de nitrogênio associada a plantas incluem os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*. Já aquelas bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre ou associativas, pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* (HAYAT et al., 2010).

Recentemente, quatro estirpes de *Burkholderia* noduladoras da planta *Mimosa* encontradas no Cerrado foram sequenciadas utilizando 16S rRNA e demonstraram grande habilidade de fixação de  $N_2$  (CHEN; YANAGIDA; SHINOHARA, 2005).

Peixoto et al. (2010) verificaram que a estrutura da comunidade bacteriana no solo do Cerrado, analisando solo nativo e solos cultivados, foi

modificada, indicando que os sistemas agrícolas podem interferir nas mudanças dentro dos nichos de microrganismos.

### 2.3.3 Actinobactérias

Um importante grupo de microrganismos, que é quase inexplorado nos solos do Cerrado, compreende as actinobactérias (SOUZA et al., 2008; VASCONCELLOS et al., 2010). As actinobactérias são amplamente distribuídas na natureza, sendo comumente encontrada no solo, principalmente na rizosfera (MERZAEVA; SHIROKIKH, 2006; SOUSA et al., 2008).

Por meio de seus metabólitos secundários, esses microrganismos podem influenciar o desenvolvimento da planta e a produção de hormônios vegetais, aumentando a disponibilidade de nutrientes minerais e também excretando antibióticos ou toxinas que atuam no controle biológico de patógenos na rizosfera (HAMDALI et al., 2008; VASCONCELLOS et al., 2010).

Eles são bem conhecidos por sua extensa produção de compostos com capacidade de solubilizar fosfatos e de compostos com elevado potencial biotecnológico, tais como quitinases e antibióticos (GOMES et al., 2000; HAMDALI et al., 2008).

A diversidade de actinobactérias no solo foi observada e 22 gêneros destas foram identificados, tais como *Actinopolysporineae*, *Corynebacterineae*, *Frankineae*, *Glycomycineae*, *Kineosporiineae*, *Micrococcineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Pseudonocardineae*, *Streptomyceae*, *Streptosporangineae*, *Nocardiodaceae*, *Actinopolysporaceae*, *Actinosynnemataceae*, *Dermacoccaceae*, *Geodermatophilaceae*, *Glycomycetaceae*, *Kineosporiaceae*, *Microbacteriaceae*, *Micromonosporaceae*, *Nocardiaceae*, *Promicromonosporaceae*, *Propionibacteriaceae*,

*Pseudonocardiaceae*, *Streptomycetaceae*, *Streptosporangiaceae* e *Thermomonosporaceae* (ZHANG et al., 2010).

Quirino et al. (2009) estudando a diversidade de bactérias do solo do Cerrado observaram uma abundância de bactérias do filo Actinobacteria identificada em ambos Cerrado sensu stricto e Cerrado convertidos para solos de pastagem.

Actinobactéria isolada dos solos do Cerrado exibem atividade quitinolítica e atividade de protease (GOMES et al., 2000). Porém é cada vez mais claro que estes habitats são pouco explorados e as actinobactérias são capazes de produzir compostos bioativos (ZHANG et al., 2010).

Barros et al. (2003) isolaram do solo de Cerrado o gênero *Nocardia cerradoensis*, que mostrou ter propriedades químicas e morfológicas típicas da *Nocardiaceae*. Este sendo pertencente ao distinto clado monofilético na árvore de 16S r DNA, juntamente com *Nocardia africana*, *Nocardia vaccinii* e *Nocardia veterana*.

Uma nova actinobactéria quitinolítica isolada do solo do Cerrado foi atribuído ao gênero *Streptomyces* com base nas características químicas e morfológicas. Análises filogenéticas do gene 16S rRNA mostraram que esta cepa, RCQ1071T, esta relacionada com *Streptomyces albulus*, com 98% de similaridade da sequência (SOUZA et al., 2008).

#### **2.3.4 Fungos filamentosos**

Os gêneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pythium*, *Verticillium* e *Alternaria* são fungos considerados os mais comuns encontrados no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Há evidências de que a diversidade de fungos nos trópicos é maior do que em regiões temperadas e que os poucos gêneros e nichos ecológicos estudados não fornecem

informações adicionais ao que já se sabe dos 5% dos fungos conhecidos na Terra (HAWKSWORTH, 2001).

Mesmo não sendo um grupo predominante no solo, os fungos representam entre 70 e 80% da biomassa microbiana do solo e sua ocorrência está condicionada a fatores como pH, umidade e quantidade de matéria orgânica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Estudos sobre diversidade das comunidades de fungos nos solos do Cerrado e algumas pastagens de agricultura foram observados representantes do filo Ascomycetes em todas as comunidades estudadas, como *Kraurogymnocarpa trochleospora*, *Chytridiomycete* e *Dothideomycetes*. Basidiomycetes, tais como *Tricholoma myomyces* e *Psilocybe stunzii* também foram identificados em todas as áreas estudadas, porém, eles foram mais abundantes em floresta do Cerrado sensu stricto, com 27,4% (CASTRO et al., 2008).

Em alguns estudos vários fungos do Cerrado não puderam ser identificados pela ausência de sequências similares depositadas no banco de dados ou, possivelmente, que estes organismos não tenham sido anteriormente isolados. Este grupo de fungos "não identificados" é mais proeminente nos solos nativos do Cerrado sensu stricto (8,2%) e floresta ribeirinha (11,4%) (CASTRO et al., 2008; JIZHENG; ZHIHONG; JANE, 2005).

Castro et al. (2008) observaram que nas áreas nativas e convertidas em pastagens do Cerrado existe uma grande diferença na distribuição de filos. A substituição extensiva da cobertura vegetal nas áreas afetadas também pode ser um fator importante na estrutura da comunidade de fungos.

Estudos sobre a contribuição de fungos micorrízicos arbusculares autóctones em solo de Cerrado degradado demonstraram que o solo da área preservada apresentou uma taxa de colonização micorrízica de 37,5%, enquanto o solo da área reflorestada apresentou 30% de colonização. Assim, apesar das

perturbações que esta área degradada vem sofrendo ao longo dos anos, os fungos micorrízicos arbusculares autóctones têm se mostrado tolerantes e com capacidade de multiplicação, mantendo o potencial de inóculo (AQUINO; CASSIOLATO, 2002).

A capacidade de um organismo sobreviver em condições adversas depende da rapidez de suas respostas fisiológicas às condições ambientais (SILVA; SIQUEIRA; SOARES, 2006). Os processos de agregação do solo, decomposição de resíduos orgânicos, mineralização de nutrientes, controle de pragas, doenças e estabelecimento de relações simbióticas são realizados com a participação efetiva dos fungos. Participam também de processos de degradação de pesticidas e podem servir como compartimentalizadores de metais pesados do solo, diminuindo a sua toxidez para o ambiente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O fungo *Penicillium sclerotiorum* foi identificado como uma fonte de metabólitos secundários que possuem atividade antibiótica. Este fungo foi isolado de amostras do solo do Cerrado e inibiu o crescimento de *Candida albicans*, *Streptomyces pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* (LUCAS; CASTRO; TAKAHASHI, 2007).

### **2.3.5 Leveduras**

As leveduras podem estar presentes no solo, na água, em tronco de árvores em decomposição, em plantas herbáceas, silagem, animal e em muitos produtos alimentícios como queijo, linguiça, produtos de carne refrigerada, e há algumas espécies que habitam ambientes marinhos (SANTOS et al., 2005).

Ahansal et al. (2008) estudaram isolados de leveduras do solo, folhas e frutos da árvore de Argan (*Argania spinosa*). As leveduras do solo foram identificadas como pertencentes aos Basidiomicetos (*Bullera variabilis* e



*Rhodotorula glutinis*), e dos frutos foram associadas a ascomicetos como *Pichia angusta* e *Zygoascus hellenicus*.

Muitas espécies de leveduras vivem como saprófitas, muitas vezes em associação com plantas, animais e são agentes importantes na biodegradação da celulose, hemicelulose, amido, pectina, ácidos orgânicos, dissacarídeos, gorduras e lignina, que é particularmente resistente à degradação bacteriana. Elas são, portanto, inestimáveis para a reciclagem de matéria orgânica. O alto valor de conservação dos mecanismos metabólicos e de regulação entre eucariotos tem contribuído para a ampla utilização de leveduras como um sistema modelo para diversos estudos biológicos (FAI; GRANT, 2009).

Muitas leveduras isoladas de plantas e ambientes florestais como o Cerrado têm mostrado propriedades de controle biológico para microrganismos patogênicos. Algumas leveduras foram patenteadas para a utilização no controle pós-colheita de doenças de frutas (AHANSAL et al., 2008).

Duas novas espécies de leveduras, *Wickerhamomyces queroliae* e *Candida jalapaonensis* foram isoladas do Cerrado a partir de larvas de *Anastrepha mucronata* (Diptera: Tephritidae) (ROSA et al., 2009).

Novas espécies de leveduras foram isoladas a partir da madeira apodrecida da Mata Atlântica e no Cerrado brasileiro. As espécies novas de levedura que degradam D-xilose estão relacionadas à *Candida jeffriesii*, *Spathaspora passalidarum* e *Spathaspora arborariae* (CADETE et al., 2009).

#### **2.4 Ferramentas para avaliação da diversidade microbiana do solo**

Durante muitos anos as técnicas de identificação e classificação de microrganismos mais empregados foram baseadas em características morfológicas e fisiológicas, denominadas técnicas tradicionais (TORSVIK et al., 1998). Entretanto, os procedimentos taxonômicos convencionais para identificar

microrganismos são ainda muito lentos, exigem muito trabalho e não são absolutamente conclusivos (CHEN; WANG; CHEN, 2008). Várias metodologias têm sido utilizadas para a identificação de microrganismos com base em características morfológicas da colônia, das células ou através da identificação em função das condições de cultivo. Apesar de que informações referentes à capacidade de assimilação de fontes de C e N, em diferentes substratos e caracterização bioquímica e fisiológica são valiosas, características fenotípicas podem ser influenciadas pela linhagem e pelas condições de cultivo (CHEN; WANG; CHEN, 2008; MOZINA et al., 1997).

O estudo da diversidade microbiana enfrenta alguns obstáculos como as dimensões microscópicas dos objetos de análises, descrições taxonômicas incompletas e inexistência de meios de isolamento e cultivo apropriados para a vasta maioria dos microrganismos (GIRAFÁ; NEVIANI, 2001). Um sério problema em ecologia microbiana é que a proporção relativa do crescimento bacteriano em placa medido pelas Unidades Formadoras de Colônia (UFC) varia de 0,1 a 1% em solo de ambiente prístino e 10% em solo de agricultura. Isto implica que investigações baseadas em isolamento microbiológico podem incluir somente uma parte minoritária da diversidade microbiana total. O estudo da porção não cultivável tornou-se possível devido ao desenvolvimento de técnicas de biologia molecular. Estas podem ser por extração, amplificação e análise de sequências de DNA diretamente dos solos, sem a necessidade de isolamento e cultivo dos microrganismos (TORSVIK et al., 1998).

As técnicas moleculares não estão livres de erros. Estes erros podem acontecer na extração dos ácidos nucleicos ou mesmo na amplificação da PCR gerada pelos iniciadores. A técnica de DGGE pode formar moléculas heteroduplex, separar somente fragmentos pequenos de até 500pb e acontecer uma co-migração de fragmentos (MUYZER; SMALLA, 1998).

A extração de DNA do solo envolve basicamente a ruptura das células microbianas presentes na amostra, e, portanto este DNA contém cromossomos de um grande número de microrganismos. Quanto maior a diversidade microbiana no solo mais sequências diferentes de DNA serão encontradas na amostra do solo (WECHTER et al., 2003). Porém, o conjunto de primers apropriados é de extrema importância, para confirmar e ampliar os resultados encontrados (ASCHER et al., 2010; BRESOLIN et al., 2010; CASTRO et al., 2008).

Analisar resultados de biologia molecular da comunidade microbiana, não se restringe apenas a extração de DNAs da comunidade bacteriana. São importantes, também, os fatores relacionados à reação de PCR, como escolha de iniciadores, concentração de DNA amplificado e comparação com outros métodos (ENWALL; HALLIN, 2009; MARTIN-LAURENT et al., 2001).

Com o advento da biologia molecular aplicada ao estudo do meio ambiente, vários tipos de marcadores foram desenvolvidos contribuindo significativamente para o avanço do conhecimento sobre a biodiversidade deste grupo. Os métodos moleculares receberam grande impulso com o desenvolvimento da técnica conhecida como PCR. Nessa técnica, pequenos e específicos segmentos do genoma de microrganismos podem ser amplificados utilizando-se primers (sequências iniciadoras) complementares a sequências localizadas em regiões específicas do genoma (CHEN; WANG; CHEN, 2008). O que ocorre é a extensão a partir dos primers, pela ação de uma DNA polimerase termoestável, a *Taq* DNA polimerase, isolada originalmente do microrganismo *Thermus aquaticus*. O DNA é desnaturado e o ciclo repetido várias vezes, o que permite a amplificação exponencial daquela sequência específica (WOESE, 1987).

As técnicas moleculares que utilizam a técnica de PCR são cada vez mais utilizadas para identificação de espécies. Dentre as técnicas desenvolvidas

a partir amplificação de regiões do rDNA seguida de sequenciamento e análise da homologia com sequências já depositadas em banco de dados têm sido utilizada com frequência para a identificação de espécies. A escolha da região a ser sequenciada é vital para a análise entre os organismos, sendo normalmente utilizado o rDNA, devido à presença e à homologia desta em todos os organismos vivos, e por possuir partes muito conservadas intercaladas por outras variáveis (WOESE, 1987).

Os produtos de PCR permitem analisar a estrutura e a diversidade da comunidade microbiana total, assim como quantificar a variação existente entre as sequências do DNA extraído do solo. Algumas metodologias que utilizam os produtos da amplificação são: Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante, (DGGE), a Eletroforese em Gel de Gradiente de Temperatura (TGGE), Conformação de Polimorfismo em Fita Simples (SSCP) e Análise dos Perfis Eletroforéticos de Fragmentos de Restrição (ARDRA) (MARTIN-LAURENT et al., 2001; MOTA et al., 2005).

A técnica de DGGE, desenvolvida por Fisher e Lerman (1983), se baseia nas diferentes propriedades de desnaturação apresentada pelas fitas duplas de DNA das moléculas.

O DGGE é uma ferramenta importante nos estudos ecológicos onde se avalia diversidade microbiana ambiental. A avaliação estatística dos perfis de bandas das amostras é expressa através de índices de similaridade entre amostras distintas e suas réplicas (ASHER et al., 2010).

Estes métodos consistem da separação e visualização de fragmentos de DNA em gel de eletroforese de acordo com diferenças em suas sequências de nucleotídeos. A riqueza de “espécies”, um dos parâmetros da biodiversidade, pode ser estimada a partir do número de bandas obtidas ao fim da análise, mudanças ocorridas entre os membros da comunidade e também a identificação filogenética dos mesmos. Apesar do largo emprego da técnica de DGGE, a

interpretação dos resultados obtidos deve ser cautelosa. Problemas de amplificação preferencial ou amplificação de diferentes operons de 16S rDNA da mesma espécie bacteriana fazem com que a técnica de DGGE seja semi-quantitativa (ASHER et al., 2010; MUYZER; SMALLA, 1998).

Mesmo assim, essa técnica permite que um grande número de amostras seja analisado a fim de caracterizar a variabilidade intrínseca das estruturas das comunidades. Essa grande quantidade de dados pode ser analisada através de ferramentas estatísticas fornecendo uma vantagem significativa para a interpretação das variabilidades observadas (MORRIS et al., 2002).

Peixoto et al. (2010) analisaram as estruturas da comunidade bacteriana em solos do Cerrado cultivado sob preparo convencional, em plantio direto e sob a vegetação nativa de Cerrado utilizando a técnica PCR-DGGE. Verificaram a presença das bactérias pela região 16S rRNA e genes *rpoB* e gene do grupo *Pseudomonas*.

Castro et al. (2008) fizeram uma abordagem molecular, com o intuito de caracterizar as comunidades fúngicas do solo utilizando a técnica PCR-DGGE em quatro áreas do bioma Cerrado, sendo uma área nativa, uma floresta ribeirinha, uma área convertida para uma plantação de soja e uma área de pastagem. Estas análises demonstraram que áreas convertidas do solo do Cerrado apresentam uma microbiota inferior a dos solos nativos do Cerrado.

Nas últimas duas décadas, vários métodos moleculares têm sido propostos (SORENSEN et al., 2009) e, recentemente, a exploração de genomas inteiros presentes em uma amostra de solo, a metagenômica, tem proporcionado uma nova abordagem para a avaliação detalhada desta microbiota (DANIEL, 2005; LANGER et al., 2006). O sequenciamento metagenômico pode determinar a complexa microbiota do solo e fornecer dados suficientes para compreender a diversidade da comunidade microbiana. O sucesso da metagenômica de solo depende de uma combinação de seleção de amostras adequadas, métodos

eficazes de extração de DNA, a clonagem, as estratégias de seleção e as abordagens necessárias para o sequenciamento (MOCALI; BENEDETTI, 2010).

## REFERÊNCIAS

- ADNAN, A. F. M.; TAN, I. K. P. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 7, p. 1380-1385, May 2007.
- AHANSAL, L. et al. Biodiversity of yeasts isolated from the indigenous forest of Argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) in Morocco. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 777-782, June 2008.
- AQUINO, S. da S.; CASSIOLATO, A. M. R. Contribuição de fungos micorrízicos arbusculares autóctones no crescimento de *Guazuma ulmifolia* em solo de cerrado degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 12, p. 1819-1823, dez. 2002.
- ASCHER, J. et al. World evaluation of the denaturing gradient gel electrophoresis apparatus as a parameter influencing soil microbial community fingerprinting. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 26, n. 9, p. 1721-1726, Sept. 2010.
- BARROS, E. V. et al. *Nocardia cerradoensis* sp. nov., a novel isolate from Cerrado soil in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, n. 1, p. 29-33, Jan. 2003.
- BERNARDES, C. M.; SANTOS, M. A. População microbiana como indicadora de interferência de diferentes manejos de solos de Cerrado com cultivo de soja. **Journal Biosciences**, Bangalore, v. 22, n. 2, p. 7-16, May/Aug. 2006.
- BRESOLIN, J. D. et al. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 391-403, Apr./June 2010.
- CADETE, R. M. et al. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 9, n. 8, p. 1338-1342, Dec. 2009.
- CASTRO, A. P. et al. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archieve Microbiology**, Paris, v. 190, n. 2, p. 129-139, May 2008.

CHAER, G. et al. Comparative resistance and resilience of soil microbial communities and enzyme activities in adjacent native forest and agricultural soils. **Microbial Ecology**, Berlin, v. 8, n. 2, p. 414-424, Aug. 2009.

CHEN, H. C.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture independent methods. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 3, p. 492-501, May 2008.

CHEN, Y. S.; YANAGIDA, F.; SHINOHARA, T. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 40, n. 3, p. 195-200, Feb. 2005.

CONSERVAÇÃO INTERNACIONAL DO BRASIL. **Cerrado**. Disponível em: <<http://www.conservation.org.br/onde/cerrado/>>. Acesso em: 20 out. 2010.

CYCON, M.; WOJCIK, M.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Biodegradation of the organ phosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp and *Pseudomonas* sp and their use in bioremediation of contaminated soil. **Chemosphere**, Netherlands, v. 76, n. 4, p. 494-501, July 2009.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 6, p. 470-478, June 2005.

ENWALL, K.; HALLIN, S. Comparison of T-RFLP and DGGE techniques to assess denitrified community in soil. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 145-148, Jan. 2009.

FAI, P. B.; GRANT, A. A comparative study of *Saccharomyces cerevisiae* sensitivity against eight yeast species sensitivities to a range of toxicants. **Chemosphere**, Netherlands, v. 75, n. 3, p. 289-296, Apr. 2009.

FEDE, K. L.; PANACCIONE, D. G.; SEXTONE, A. J. Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size-fractionated soil bacteria by BIOLOGR community-level physiological profiles and restriction analysis of 16S rDNA genes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 1555-1562, Sept. 2001.

FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. **Biochemistry**, London, v. 80, n. 6, p. 1579-1583, Mar. 1983.



GIRAFFA, G.; NEVIANI, E. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v. 67, n. 1/2, p. 19-34, July 2001.

GOBERNA, M. et al. Microbial community structure at different depths in disturbed and undisturbed semiarid Mediterranean forest soil. **Microbial Ecology**, Berlin, v. 5, n. 40, p. 315-326, Oct. 2005.

GOMES, N. C. M. et al. Bacterial diversity of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, Pretoria, v. 232, n. 1, p. 167-180, May 2001.

GOMES, R. C. et al. Chitinolytic activity of actinomycetes from a Cerrado soil and their potential in biocontrol. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 146-150, Dec. 2000.

\_\_\_\_\_. Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a Cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 2, p. 653-661, Apr. 2001.

GUCKER, B.; BOECHAT, I. G.; GIANI, A. Impacts of agricultural land use on ecosystem structure and whole-stream metabolism of tropical Cerrado streams. **Freshwater Biology**, Chicago, v. 54, n. 10, p. 2069-2085, Oct. 2009.

HAMDALI, H. et al. Screening for rock phosphate solubilizing actinomycetes from Moroccan phosphate mines. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 12-19, Jan. 2008.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, New York, v. 105, n. 4, p. 1422-1432, Dec. 2001.

HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals Microbiology**, Berlin, v. 60, n. 4, p. 579-598, July 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Ecossistemas brasileiros**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/cerrado.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2010.

JIZHENG, H.; ZHIHONG, X.; JANE, H. Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes. **FEMS Microbiology Letter**, Amsterdam, v. 247, n. 1, p. 91-100, June 2005.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 707-713, June 2005.

LANGER, M. et al. Metagenomics: an inexhaustible access to nature's diversity. **Biotechnology Journal**, Berlin, v. 1, n. 7/8, p. 815-821, Aug. 2006.

LUCAS, E. M. F.; CASTRO, M. C. M. de; TAKAHASHI, J. A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, is ochromophilone and Pencolide, metabolites from a Brazilian Cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* van beyma. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 785-789, Oct./Dec. 2007.

MARTIN-LAURENT, F. et al. DNA extraction from soil: old bias for new microbial diversity analysis methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2354-2359, May 2001.

MELLONI, R. et al. Características biológicas de solos sob mata ciliar e campo cerrado no sul de minas gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 7-13, jan./fev. 2001.

MERZAEVA, O. V.; SHIROKIKH, I. G. Colonization of plant rhizosphere by actinomycetes of different genera. **Microbiology**, New York, v. 75, n. 2, p. 226-230, May 2006.

MOCALI, S.; BENEDETTI, A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. **Research in Microbiology**, Netherlands, v. 161, n. 6, p. 497-505, July/Aug. 2010.

MOREIRA, F. M. de S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MORRIS, C. E. et al. Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. **Microbiology and Molecular Biology**, New York, v. 66, n. 4, p. 592-616, Dec. 2002.

MOTA, F. F. et al. Assessment of the diversity of Paenibacillus species in environmental samples by a novel rpoB-based PCR-DGGE method. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 53, n. 2, p. 317-328, July 2005.

MOZINA, S. S. et al. Identification of Saccharomyces sensu stricto and Torulaspora yeasts by PCR ribotyping. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 311-315, Apr. 1997.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 73, n. 1, p. 127-141, Oct. 1998

PEIXOTO, R. S. et al. A decade of land use contributes to changes in chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 98, n. 3, p. 403-413, May 2010.

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. Dinâmica das populações bacterianas em solos de Cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 801-811, maio 1999.

PEREIRA, R. M. et al. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 439-447, Oct. 2006.

PIMENTA, R. S. et al. Yeast communities in two Atlantic rain Forest fragments in Southeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 5, p. 90-35, Feb. 2009.

QUIRINO, B. et al. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiology Research**, New York, v. 164, n. 1, p. 59-70, Jan. 2009.

ROESCH, L. F. W. et al. Screening of diazotrophic bacteria *Azopirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Dordrecht, v. 23, n. 10, p. 1377-1383, Mar. 2007.

ROSA, C. A. et al. *Wickerhamomyces queroliae* sp. nov. and *Candida jalapaonensis* sp. nov., two yeast species isolated from Cerrado ecosystem in North Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Oxford, v. 59, n. 5, p. 1232-1236, May 2009.

ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 39-67, Jan. 2001.

SANTOS, L. B. S. et al. Yeast diversity in hypersaline habitats. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 244, n. 2, p. 229-234, Feb. 2005.

SILVA, S. da; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1749-1757, dez. 2006.

SORENSEN, J. et al. Molecular tools in rhizosphere microbiology from single-cell to whole-community analysis. **Plant and Soil**, The Hague, v. 321, n. 1/2, p. 483-512, Feb. 2009.

SORENSEN, S. R.; ALBERS, C. N.; AAMAND, J. Rapid mineralization of the phenyl urea herbicide diuron by *Variovorax* sp. strain SRS16 in pure culture and within a two-member consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 8, p. 2332-2340, Feb. 2008.

SOUZA, R. F. de et al. *Streptomyces lunalinharesii* sp. nov., a chitinolytic *Streptomyces* isolated from Cerrado soil in Brazil. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, Oxford, v. 58, n. 12, p. 2774-2778, Dec. 2008.

SPRENT, J. I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms**. London: Chapman and Hall, 1990. 256 p.

STURSA, P. et al. Approaches for diversity analysis of cultivable and non-cultivable bacteria in real soil. **Plant Soil and Environment**, Praha, v. 55, n. 9, p. 389-396, Sept. 2009.

TOLEDO, L. de O. et al. Análise multivariada de atributos pedológicos e fitossociológicos aplicada na caracterização de ambientes de Cerrado no norte de Minas Gerais. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 5, p. 957-968, jun. 2009.

TORSVIK, V. et al. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, Netherlands, v. 64, n. 1, p. 53-62, Sept. 1998.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 240-245, May 2002.

UROZ, S. et al. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. **Trends in Microbiology**, Netherlands, v. 17, n. 8, p. 378-387, Aug. 2009.

VASCONCELLOS, R. L. F. et al. Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere soil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 6, p. 743-746, 2010.

WECHTER, P. et al. A rapid, cost-effective procedure for the extraction of microbial DNA from soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 85-91, Dec. 2003.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Review**, London, v. 51, n. 2, p. 221-271, June 1987.

ZHANG, Y. et al. Diversity of culturable actinobacteria from Qinghai-Tibet plateau, China. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 98, n. 3, p. 213-223, Mar. 2010.

## CAPÍTULO 2

### **Perfil da comunidade microbiana presente no solo de cerrado brasileiro em três diferentes regiões do estado de Minas Gerais**

#### **RESUMO**

A estrutura da comunidade microbiana nos solos de três regiões do Cerrado brasileiro do Estado de Minas Gerais, foi investigada por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Amplificações dos fragmentos do gene 16S rRNA para bactérias e das regiões 18S rDNA e ITS para a comunidade fúngica foram realizados e as bandas detectadas cortadas do gel e reamplificadas para posterior sequenciamento. Foi possível verificar diferença entre as comunidades de acordo com a região de amplificação do gene, ou seja, as mesmas amostras apresentaram perfis diferentes quando se utilizou diferentes primers, possibilitando um maior conhecimento da comunidade. Os gêneros bacterianos identificados foram *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Escherichia* e *Leuconostoc*. A comunidade fúngica foi representada pelos gêneros *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Lachancea* e *Cladosporium*. As populações microbianas foram semelhantes quando comparado os solos das três áreas analisadas na estação chuvosa e seca. Os parâmetros físico-químicos não foram influentes na microbiota demonstrando que os microrganismos *Zygosaccharomyces* sp., *Candida* sp., *Lachancea meyersii*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cowanii*, *Klebsiella pneumoniae* foram dominante nos solos do Cerrado mineiro. Este foi o primeiro estudo da caracterização da comunidade microbiana em solos do Cerrado brasileiro pertencente ao estado de Minas Gerais. Sugere-se, portanto, que novos estudos sejam realizados para conhecimento da diversidade microbiana em áreas nativas do Cerrado visando à preservação e compreensão ecológica deste bioma.

Palavras-chave: Cerrado. PCR-DGGE. Diversidade.

## ABSTRACT

The microbial community structures in soil from three regions of the Minas Gerais's Cerrado were investigated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Amplifications of fragments from the gene 16S rRNA for bacteria and from the regions 18S rDNA and ITS for fungal community were made, as the bandings were detected, they were cut off from the gel and re-amplified for subsequent sequencing. It was possible to verify the difference between the communities according to the region of gene amplification, e.g. the same samples showed different profiles when using different primers, allowing a greater knowledge of the community. The bacterial genera *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Escherichia*, and *Leuconostoc* were identified. The fungal community was represented by the genera *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Cladosporium*, and *Lachancea*. The microbial populations were similar when comparing the soils from the three analyzed areas in rainy and dry season. The physicochemical parameters were not influential in the environment, demonstrating that the microorganisms *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Lachancea meyersii*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cowanii*, *Klebsiella pneumoniae* were dominant in Minas Gerais' Cerrado soil. This was the first study about characterization of microbial communities in the Brazilian Cerrado soil in the State of Minas Gerais. It is suggested therefore that further studies are conducted to improve the knowledge about microbial diversity in natural areas of Cerrado aiming at preservation and ecological understanding of this biome.

Keywords: Cerrado. PCR-DGGE. Diversity.

## 1 INTRODUÇÃO

O bioma Cerrado (savana tropical) ocupa cerca de 24% do território brasileiro e é caracterizado por apresentar uma temperatura média em torno de 22-27°C, a precipitação entre 800 - 1,600 mm e radiações solares de 475-500 Cal cm<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>. Os solos desse bioma são altamente intemperizados, o que os torna ácido, pobre em nutrientes e rico em óxidos de ferro e alumínio (PEIXOTO et al., 2010). No Brasil, este bioma engloba os estados de Goiás, Distrito Federal e parte dos estados da Bahia, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, Rondônia e Tocantins (GUCKER; BOECHAT; GIANI, 2009).

No estado de Minas Gerais, as regiões amostradas de Arcos, Passos e Luminárias são áreas preservadas e categorizadas pelo projeto Biota Minas como áreas de alta importância biológica visando à preservação da biodiversidade destes locais. No entanto, os avanços agrícolas que ocorreram durante os últimos 30 anos, fez com que o Cerrado tornasse a zona de produção principal de grãos no Brasil (PEIXOTO et al., 2010). Este bioma está sendo ameaçado pela crescente expansão agrícola e não se sabe como esta conversão em áreas de pastagens pode afetar as comunidades microbianas autóctones (RODRIGUES, 2005). Apesar de sua importância biológica, o Cerrado tem sido o foco de poucos estudos sobre sua macro e micro diversidade (CASTRO et al., 2008; TOLEDO et al., 2009).

Os microrganismos do solo estão intimamente ligados às propriedades físico-químicas destes e são importantes na manutenção de importantes funções no ecossistema terrestre, como na ciclagem de nutrientes, resíduos orgânicos, na degradação de contaminantes, na formação e estabilização da estrutura do solo (WALLIS et al., 2010). A função e a diversidade das comunidades bacterianas e fúngicas podem ser um indicador mais eficiente e dinâmico da qualidade do solo



do que aquelas baseadas em propriedades físicas e químicas. Entretanto, pouco se sabe sobre os fatores que afetam diversidade, em parte devido à complexidade das comunidades, mas também porque nem todos os microrganismos podem ser cultivados sob condições de laboratório (BRESOLIN et al., 2010).

A aplicação de técnicas moleculares em estudos de ecologia microbiana tem sido frequentemente utilizada para explorar a diversidade microbiana e analisar a estrutura das comunidades existentes (ASCHER et al., 2010; BRESOLIN et al., 2010; CASTRO et al., 2008; NAKATSU, 2007). As abordagens moleculares independente de cultivo provaram ser ferramentas úteis na criação de um inventário mais completo da diversidade microbiana em amostras ambientais (NAKATSU, 2007) e a técnica PCR-DGGE tem sido aplicada com êxito para avaliar a microbiota do solo (ASCHER et al., 2010). Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil das comunidades microbianas presentes nos solos conservados do Cerrado de Minas Gerais utilizando a técnica de DGGE a partir da amplificação de fragmentos de DNA com diferentes primers.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Descrições do local e amostragem do solo**

As amostras foram coletadas nas regiões de Arcos (20°49'48.0"S; 046°30'54.9"W), Luminárias (21°37'51.5"S; 044°59'11.0"W) e Passos (20°14'51"S; 045°31'40.8"W). Uma descrição geral de cada local está apresentada na Figura 2.

Trinta amostras compostas foram coletadas em áreas preservadas durante os meses de Janeiro (baixa precipitação pluviométrica com uma média de 875mm) e Agosto (alta precipitação pluviométrica com uma média de 75mm) de 2010. Cada amostra composta foi formada por 12 sub-amostras, coletadas na profundidade de 0-20 cm, dentro de um círculo de diâmetro de 3 a 6 metros a partir do centro (Fig. 2c). Antes de coletar as sub-amostras em cada ponto de amostragem, todo o equipamento foi flambado para evitar a contaminação a partir do ponto anterior. As amostras de solo foram colocadas em sacos plásticos estéreis (Nasco ®) e armazenadas a 4°C até posterior utilização.

### **2.2 Extração do DNA e análise de PCR-DGGE**

Cada amostra (cerca de 0.25g de solo) foi transferida para um eppendorf e foi submetido à extração de DNA usando o kit Max Power Solo DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA genômico foi utilizado como molde para a amplificação do DNA microbiano nas regiões alvo do ribossomo. Dois pares de primers foram utilizados para a análise de cada comunidade microbiana. A Tabela 1 apresenta informações sobre os primers. A comunidade bacteriana foi submetida às seguintes condições de amplificação: aquecimento a 95°C/5 min,

seguido por 30 ciclos de 60s a 92°C, anelamento a 55°C /60s e extensão a 72°C/60s, e extensão final de 72°C/10 min. Na comunidade fungica as mesmas condições foram realizadas porém com 35 ciclos.

A análise de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) foi realizada no sistema BioRad Dcode (BioRad). As amostras de DNA amplificadas foram colocadas em um gel 8%, com o gradiente desnaturante de 30-60% para bactéria e 12-60% para fungos, em uma corrida a 16h a 70V a 60°C e os géis foram corados com Syber Green por 30 min.

### **2.3 Sequenciamento das bandas de DGGE**

As bandas do gel de PCR-DGGE foram excisadas com uma lâmina estéril, e o DNA foi purificado utilizando o kit QIAEX II (Qiagen, Chatsworth, CA, EUA), segundo o protocolo do fabricante. O DNA recuperado de cada banda de DGGE foi reamplificado usando os mesmos primers para as bactérias e fungos (Tabela 1), sem grampo GC. Os amplicons do PCR foram sequenciados pela Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul). As sequências mais próximas a partir de parciais sequências do DNA ribossomal foram obtidas do GenBank (BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL - BLAST, 2010).

O perfil de similaridade das comunidades microbianas em diferentes solos do Cerrado mineiro foi determinada com base na presença ou ausência de bandas detectadas por DGGE. Os géis foram analisados utilizando o software BioNumerics (versão 1.5, Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) para determinar a diversidade dos amplicons com imagens do gel normalizado usando a identidade interna das bandas como referência. A semelhança entre os perfis foram calculados utilizando o coeficiente de Jaccard e um dendrograma com ligação média (método em grupo não pareado através de média aritmética; UPGMA) foi obtido para os perfis de DGGE dos procariotos e de eucariotos separadamente.

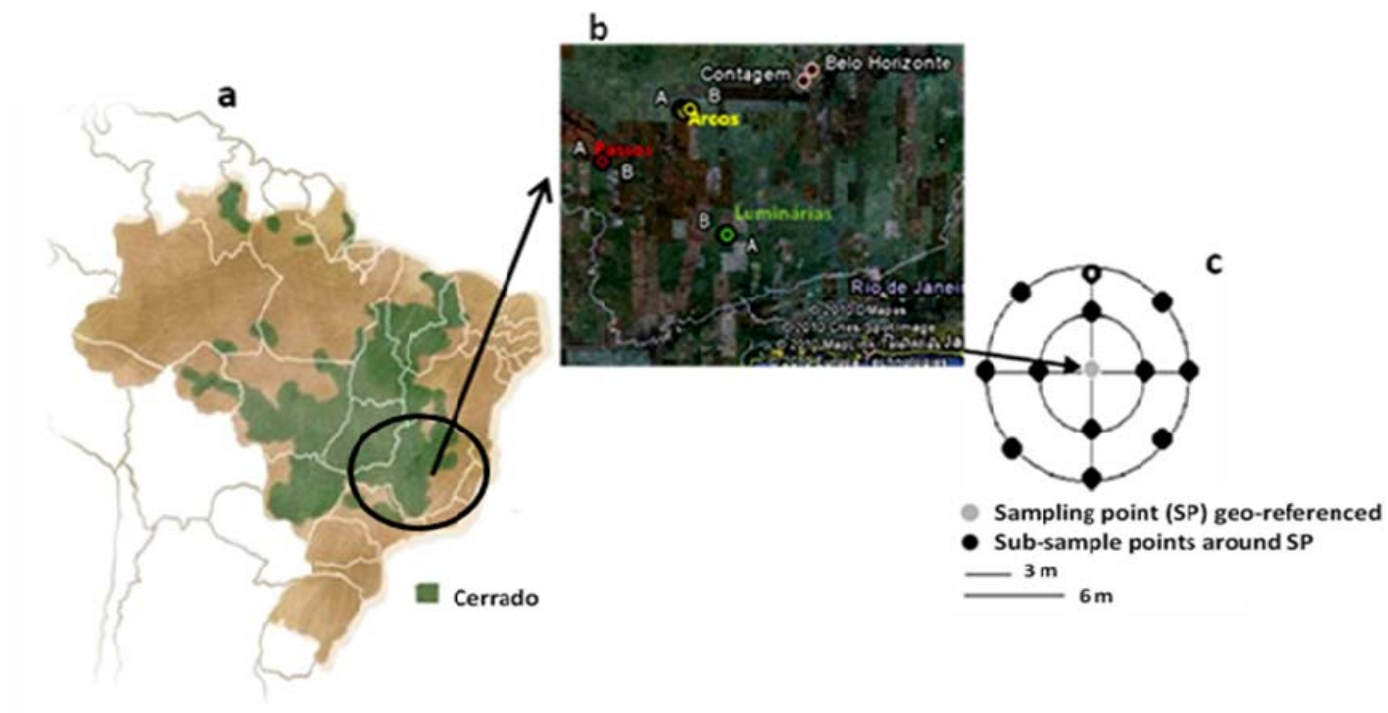


Figura 2 a. Representação da localização dos solos amostrados do Cerrado em Minas Gerais no Brasil. b. Locais de amostragem nas cidades de Arcos, Passos e Luminárias no estado de Minas Gerais. c. Distribuição da amostragem por pontos. Uma amostra de solo composta consistiu de 12 sub-amostras coletadas em torno de um ponto central

Tabela 1 Primers utilizados nas reações de PCR-DGGE para detectar as comunidades de bactérias e fungos nos solos do Cerrado mineiro

Primer	Sequencia (5' – 3')	Comunidade	Região alvo	Referências
968fGC	AAC GCG AAG AAC CTT AC Grampo GC conectado a extremidade 5' e 968f	Bacteriana	Região V6-V8 do gene 16S rRNA	Magalhães et al. (2010)
1401r	CGG TGT GTA CAA GAC CC			
338fGC	GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG Grampo GC conectado a extremidade 5' e 338fgc	Bacteriana	Região V3 do gene 16S rRNA	Magalhães et al. (2010)
518 ITS1fGC	ATT ACC GCG GCT GCT GG TCC GTA GGT GAA CCT GCG G Grampo GC conectado a extremidade 5' e ITS1gc	Eucarioto	Região ITS do rDNA	White et al. (1990)
ITS4r	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
NS3fGC	GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC Grampo GC conectado a extremidade 5' e NS3gc	Eucarioto	Região 18S do rDNA	Magalhães et al. (2010)
YM951r	TTG GCA AAT GCT TTC GC			

Grampo GC - CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GG , f - forward primer; r - reverse primer

## 2.4 Análise físico-química do solo do Cerrado mineiro

As características físicas e químicas do solo foram analisadas usando aproximadamente 200 g de cada amostra composta. Após extração com Mehlich-1, o K foi determinado por fotometria e o P analisado por espectrofotometria a 660 nm (DEFELIPO; RIBEIRO, 1997). O pH do solo foi medido a partir de 1: 2,5 da suspensão solo: água utilizando-se pHmetro MICRONAL. Os teores de Al, Ca e Mg, após a extração com KCl 1 mol/l, Ca e Mg foram determinados por espectrometria de absorção atômica e o Al por titulação ácido-base (DEFELIPO; RIBEIRO, 1997). O potencial de acidez (H + Al) foi estimado por uma equação com base no pH determinado em solução de tampão (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 1997). O carbono orgânico foi determinado por oxidação com dicromato de N e o N total foi determinado pelo método de Kjeldahl. O cálculo de bases trocáveis (SB) foi realizado pela soma dos teores de Ca, Mg, Na e K. A textura do solo foi determinada com densímetro Bouyoucos após o uso de NaOH 1 mol/L (LANYON; HEALD, 1982). O Sistema SAS 9.1 foi utilizado para a análise estatística com o procedimento de modelo linear geral (GLM).

A correlação entre os solos de Cerrado e as variáveis físico-químicas foram submetidas à análise estatística (análise de componentes principais ou PCA) utilizando o software Unscrambler® 9,7 (CAMO, Oslo, Noruega).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Identificação e avaliação dos diferentes primers utilizados nas comunidades de bactérias e fungos no solo do Cerrado mineiro

Neste estudo, quatro dos primers comumente utilizados (MAGALHÃES et al., 2010; WHITE et al., 1990) para PCR-DGGE, foram selecionados para avaliar o perfil da comunidade microbiana nos solos de Cerrado mineiro. Os primers 968fGC / 1401r (região V6-V8) e 338fGC/518r (região V3) visando à amplificação de diferentes regiões do 16S do rDNA e os primers ITS1fGC/ITS4r e NS3fGC/YM951r visando à região do espaçador transcrito interno e regiões 18S do rDNA (Figuras 3 e 4).

Os primers ITS1 (GARDES; BRUNS, 1993) e ITS4 (WHITE et al., 1990) utilizados neste trabalho, parecem ter especificidade para os fungos Ascomicetos, Basidiomicetos e Zigomicetos (IZZO; AGBOWO; BRUNS, 2005; MANTERA; VIVANCOB, 2007).

Os dois pares de primers para cada comunidade foram capazes de amplificar as amostras de solo. O uso do primer ITS1fGC/ITS4r para fungos apresentou uma maior diversidade de bandas, sendo identificado como *Cladosporium* sp., que não foi detectado com o uso do primer NS3fGC/YM951r. Ambos primers foram capazes de detectar a presença das leveduras *Lachancea meyersii*, *Zygosaccharomyces* e *Candida*. Porém somente o primer ITS1fGC/ITS4r foi capaz de diferenciar fungos filamentosos de leveduras.

As limitações dos primers ainda é desconhecida e não se sabe o efeito destes na diversidade da comunidade fúngica (ANDERSON; CAIRNEY, 2004).

Na comunidade de bactérias, o par de primers 338fGC/518r da região V3 foi capaz de demonstrar uma maior variedade de bandas, com a identificação

de *Bacillus subtilis*, *Pantoea agglomerans*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterobacter* sp., *Escherichia coli* que não vista pelo par de primers 968fGC/1401r da região V6-V8 do 16Sr RNA.

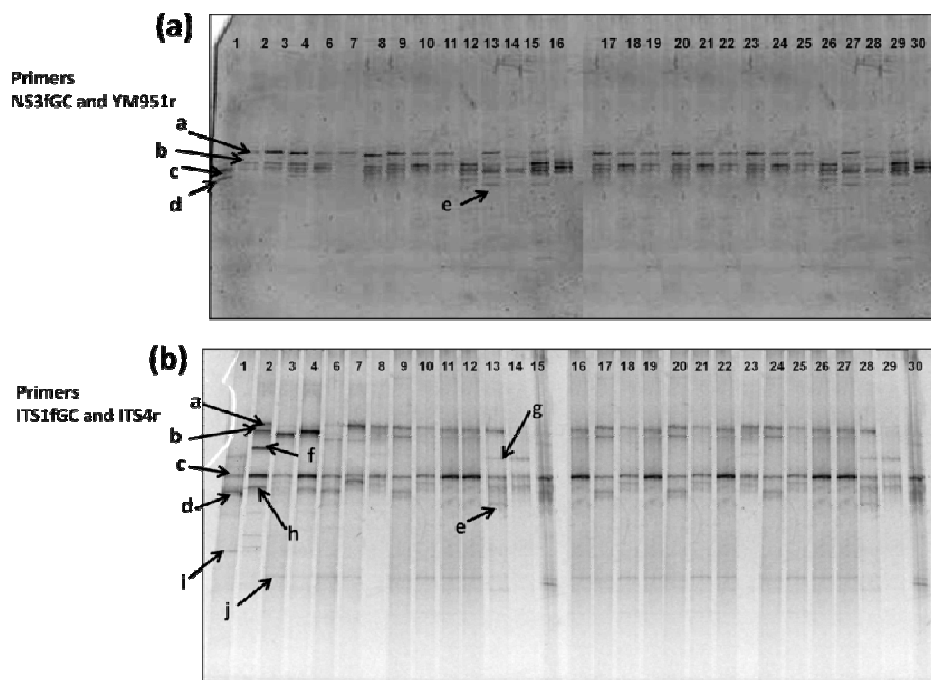


Figura 3 Análise de DGGE da comunidade fúngica 18S (a) e ITS (b) dos fragmentos de rDNA amplificados das amostras de solo. Banda a - *Zygosaccharomyces* sp. AF017728.1. Banda b - *Candida* sp. GI190714325. Banda c - *Lachancea meyersii* AY645661.1. Banda d - AB534344 fungo não cultivado. Banda e - Ascomycota não cultivado GQ404775. Banda f - AY969178 zygomycete não cultivado. Banda g - *Cladosporium* sp. FJ950740. Banda h - fungo do solo não cultivado DQ421005.1. Banda i - *Cladosporium oxysporum* AJ300332.1. Banda j - não identificado. Números referem-se a diferentes localidades: 1-4 região de Passos (estação chuvosa) e 16-20 (estação seca); 6-10 região de Luminárias (estação chuvosa) e 21-25 (estação seca); 11-15 região de Arcos (estação chuvosa) e 26 -30 (estação seca)



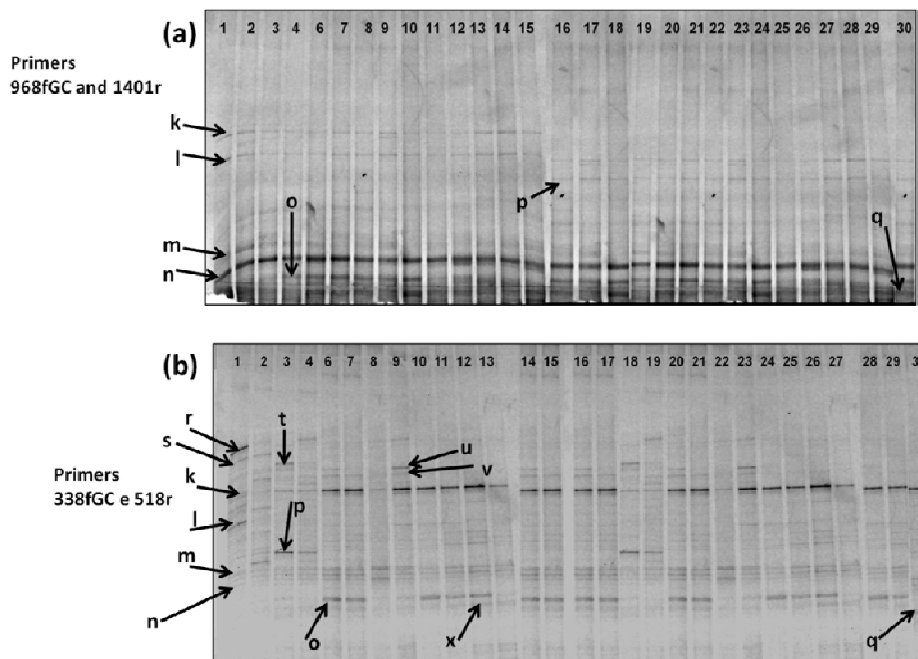


Figura 4 Análise de DGGE da comunidade bacteriana 16S rRNA na região V6-V8 (a) e região V3 (b) amplificados a partir de amostras de solo. Banda k - bactéria não cultivável do solo GU598579.1. Banda l - AB281478 *Bacillus macerans*. Banda m - *Klebsiella pneumoniae* CP000964. Banda n - *Enterobacter cowanii* FJ357832. Banda o e r - *Bacillus subtilis* EU000054. Banda p - bactéria não cultivável EF014703.1. Banda q e s - não identificado. Banda t - *Pantoea agglomerans* DQ122371. Banda u - EU026432 *Escherichia coli*. Banda v - *Enterobacter* sp. EU304794. Banda x - *Leuconostoc mesenteroides* AB02741. Números referem-se a diferentes localidades: 1-4 região de Passos (estação chuvosa) e 16-20 (estação seca); 6-10 região de Luminárias (estação chuvosa) e 21-25 (estação seca); 11-15 região de Arcos (estação chuvosa) e 26 -30 (estação seca)

Tabela 2 Diversidade das comunidades de bactérias, fungos e leveduras a partir das bandas do DGGE, após o sequenciamento, encontradas nos solos das regiões amostradas de Passos, Luminárias e Arcos durante as estações chuvosa e seca do Cerrado de Minas Gerais

<b>Cerrado</b>	<b>Estações</b>	<b>Bactéria</b>	<b>Levedura</b>	<b>Fungo</b>
<b>Passos</b>	<b>Chuvosa</b>	<i>Bacillus macerans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Enterobacter cowanii</i>	<i>Zygosaccharomyces</i> sp. <i>Candida</i> sp <i>Lachancea meyersii</i>	<i>Cladosporium oxysporum</i>
	<b>Seca</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cowanii</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Zygosaccharomyces</i> sp. <i>Candida</i> sp <i>Lachancea meyersii</i>	
<b>Luminárias</b>	<b>Chuvosa</b>	<i>Bacillus macerans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Enterobacter cowanii</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Zygosaccharomyces</i> sp. <i>Candida</i> sp <i>Lachancea meyersii</i>	
	<b>Seca</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cowanii</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Zygosaccharomyces</i> sp. <i>Candida</i> sp <i>Lachancea meyersii</i>	
<b>Arcos</b>	<b>Chuvosa</b>	<i>Bacillus macerans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Enterobacter cowanii</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Zygosaccharomyces</i> sp. <i>Candida</i> sp <i>Lachancea meyersii</i>	<i>Cladosporium</i> sp.
	<b>Seca</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterobacter cowanii</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Zygosaccharomyces</i> sp. <i>Candida</i> sp <i>Lachancea meyersii</i>	<i>Cladosporium</i> sp.

Embora muitos estudos tivessem demonstrado claramente a ampla aplicabilidade da técnica de PCR-DGGE para discriminar entre as bactérias/fungos (ASCHER et al., 2010; BRESOLIN et al., 2010; CASTRO et al., 2008; HOSHINO; MORIMOTO, 2008; NAKATSU, 2007), este trabalho demonstra que a seleção dos conjuntos de primers apropriados é importante. Estes iniciadores podem afetar na análise da diversidade dos perfis, porém, enquanto esperava-se também diversidade entre os microrganismos, isto não pode ser visto, já que os microrganismos identificados não foram diferentes, predominando uma mesma população. Nossos resultados demonstraram que a segmentação por regiões rDNA diferentes podem, às vezes, levar a resultados diferentes na análise da diversidade dos perfis, que não verificado quanto à microbiota presente. Analisando os resultados verificou-se que algumas espécies foram representadas em posições diferentes do gel ou mesmo que puderam aparecer no mesmo local, podendo ser descrita pela co-migração do DNA de diferentes espécies na mesma faixa (SEKIGUCHI et al., 2001) ou formação de várias bandas na amplificação de genes de genomas individuais (NÜBEL et al., 1996). Este resultado pode fornecer informações incorretas sobre dominância e diversidade de determinados ribotipos na comunidade. Vários métodos moleculares que visam avaliar as comunidades do solo têm sido desenvolvidos, porém a técnica mais representativa é a do DGGE, que apresenta grande potencial por contribuir uma melhor compreensão do papel ecológico dos microrganismos neste habitat (ASCHER et al., 2010; BRESOLIN et al., 2010; CASTRO et al., 2008; NAKATSU, 2007).

Na identificação das espécies de bactérias e fungos (Figs. 3 e 4), as bandas foram excisadas, re-amplificadas e os fragmentos de DNA eluídos foram utilizados para o sequenciamento. As sequências exibiram uma identidade maior que 98% com sequências disponíveis no GenBank. Foram identificados

*Zygosaccharomyces* sp., *Candida* sp., *Lachancea meyersii*, fungos ascomicota e zigomicota não cultivável, *Cladosporium* sp. e *Cladosporium oxysporum*.

Vital et al. (2002) também verificou a presença de diversas leveduras dos gêneros *Candida* spp. e *Zygosaccharomyces* spp. além do fungo *Cladosporium* spp. no solo da Amazônia brasileira utilizando a região 26S do rDNA. O fungo *Cladosporium oxysporum* foi encontrado somente na estação chuvosa de Passos, este fungo caracteriza-se pelo seu alto poder de biorremediação (Tab. 2) (MUKHERJEE; MITTAL, 2005), com conídios nodulosos, atuando como saprófitas, geralmente encontrados nas folhas e caules de plantas (BENSH et al., 2010). Em nossos resultados, após observar a microbiota presente no solo do Cerrado, algumas espécies microbianas foram relacionadas com fungos e bactéria de solo não cultiváveis, que foi verificado por Bresolin et al. (2010). Castro et al. (2008) observaram dominância de 90,5% de Ascomycetos em solos de pastagem no Cerrado, demonstrando semelhante dominância em nossos resultados em ambientes nativos. As leveduras do gênero *Zygosaccharomyces* spp., encontrada em ambos os géis de DGGE em todas as três áreas analisadas, estão envolvidas na deterioração da matéria orgânica, caracterizadas como osmotolerantes e vivem em ambientes ácidos.

*Lachancea meyersii* foi encontrado em todos os perfis de bandas, tanto no período chuvoso e quanto no seco com o primer ITS1fGC/ITS4r demonstrando que esta população é dominante no solo do Cerrado (Tabela 2) (ASHER et al., 2010). Esta espécie também foi dominante em solos de manguezais, caracterizada por desempenhar um papel importante na cadeia alimentar detritica (HYDE et al., 2002), ser homotálica, possuir formas de ascósporos esféricos, crescer na falta de galactose e presença de maltose (FELL; STATZELL-TALLMAN; KURTZMAN, 2004).

Foram identificadas as bactérias: *Bacillus macerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cowanii*, *Pantoea agglomerans*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Leuconostoc mesenteroides* e *Bacillus subtilis*.

*Bacillus subtilis* foi encontrado em bandas em diferentes posições no gel e em todos os locais amostrados. Estes padrões de bandas múltiplas podem ser devido a microheterogeneidade da sequência entre várias cópias do gene 16S rDNA desta cepa (NÜBEL et al., 1999). Uma única espécie pode apresentar várias cópias de rDNA podendo superestimar a diversidade da comunidade detectada pelo DGGE, porque a técnica poderia ter favorecido a extração dessa espécie. Outra explicação para as diferentes posições das bandas se deve pelos microrganismos do grupo *Bacillus subtilis* serem formados por oito espécies indistinguíveis pelo gene 16S rRNA, as espécies são *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. subtilis* subsp. *Spizizenii* e *B. sonorensis*. A diferença entre este grupo ocorre somente pelo gene *gyrB* (WANG et al., 2007). As espécies de *Bacillus* spp. também foram encontrada por Quirino et al. (2009) em amostras de solo de Cerrado conservado.

As espécies de *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pantoea agglomerans* e *Escherichia coli* estão associadas com pequenos mamíferos e insetos e são encontradas naturalmente no solo, água e plantas (QUIRINO et al., 2009). *Leuconostoc mesenteroides* não é comumente encontrados no solo, entretanto esta levedura foi detectada em todos os solos com excessão da estação chuvosa de Passos, mas ja foi identificada nos trabalhos de Kawasaki et al. (1996) e Yanagida, Chen e Shinohara (2006) em solos na província de Yamanashi, no Japão. Poucos estudos foram realizados sobre sua importância no solo, demonstrando somente interesse em seu potencial biotecnológico como produção de bacteriocina, ácido láctico e dextrana (YANAGIDA; CHEN; SHINOHARA, 2006). A bactéria *Pantoea agglomerans* foi encontrada somente na região de

Passos nas estações chuvosa e seca. Esta espécie é descrita como importante na regulação do teor de água do solo e no crescimento das plantas (SARTORI; VALDEBENITO; RIBEIRO, 2008). *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cowanii* foram encontradas nas três áreas analisadas tanto na estação seca como na chuvosa demonstrando ser uma bactéria dominante no solo do Cerrado. *Klebsiella pneumoniae* é caracterizada como gram negativa, em forma de bastonetes, fixadora de nitrogênio, se associam a plantas para produzir nitrogenase e no solo podem apresentar alta atividade nitrilase degradando compostos complexos (INIQUEZ; DONG; TRIPLETT, 2004). *Enterobacter cowanii* é comumente encontrada em solos ácidos, promovem o crescimento de plantas, são gram negativas e psicrotróficas (DEEPA; DASTAGER; PANDEY, 2010).

Na comunidade fúngica e bacteriana foram encontrados 13 gêneros, provavelmente representando somente as espécies mais abundantes, os demais foram caracterizados como “não cultiváveis” demonstrando que uma maior comunidade poderia ter sido encontrada. A presença de comunidades "não cultiváveis" em solos nativos do Cerrado também foi verificada por Castro et al. (2008) em diferentes tipos de solo do estado de Goiás no Brasil e Jizheng, Zhihong e Jane (2005) na Austrália subtropical. Outro fator pode ter sido a extração dos ácidos nucléicos que favoreceu estes gêneros ou mesmo a amplificação da PCR gerada pelos iniciadores (MUYZER; SMALLA, 1998).

Analisando os perfis do DGGE (Figura 3a) foi possível verificar que o uso do primer NS3fGC/YM951r em quatro regiões amostradas de Passos apresentou o mesmo perfil de bandas, tanto na estação chuvosa quanto na estação seca. As amostras da região de Luminárias apresentaram o mesmo perfil, com exceção da amostra 7, onde a estação seca desta amostragem apresentou mais bandas do que no período chuvoso. Todos os perfis da região de Arcos variaram entre as estações. Dentro da região de Arcos foi possível observar uma

maior diversidade entre os perfis, porém esta diversidade não foi verificada em relação a espécies. A análise do primer ITS1fGC/ITS4r (Figura 3b) mostrou grande variedade de perfis nas amostras e nas estações do ano. Os perfis das amostras oriundas das regiões de Luminárias e Passos mostraram grande diversidade de perfis na estação chuvosa e Arcos os mesmos microrganismos predominaram em ambos os períodos. Na análise da diversidade dos perfis com o primer 968f/1401r (Figura 4a) foi possível observar uma distinção entre os microrganismos presentes na estação chuvosa e na estação seca em todos os locais amostrados. Com este primer foi observado uma pequena variação entre os perfis.

Na análise da região V3 pelo primer 338f/518r (Figura 4b) foi possível verificar maior diversidade de perfis para a comunidade bacteriana em comparação ao outro primer, porém este primer não diferenciou as estações chuvosa das secas verificada no primer 968f/1401r. Dentro da região de Passos e Luminárias as amostras variaram pouco entre as estações seca e chuvosa, demonstrando a presença de algumas bandas diferentes. Na região de Arcos não foi encontrada diferença entre os perfis na estação chuvosa e seca..

### **3.2 Análise da diversidade da comunidade do solo do Cerrado de Minas Gerais**

A diversidade descrita como o número total e abundância das comunidades pode não ser determinável nos solos devido às limitações na definição taxonômica e nos métodos. Deste modo a composição das comunidades podem ser descritas através da diversidade dos microrganismos presentes na comunidade avaliando a diferença entre as comunidades (ANDERSON; CAIRNEY, 2004; KIRK et al., 2004; SCHWARZENBACH; ENKERLI; WIDMER, 2007).

Comparações na comunidade microbiana foram realizadas por análise de agrupamento do gel de DGGE (regiões V6-V8 e V3 para as bactérias, regiões ITS e 18S para fungos) de acordo com a correlação de Jaccard e dendogramas e as respectivas similaridades foram construídos utilizando métodos UPGMA (Figuras 5 e 6 e Tabela 3). Pode-se observar que nos 4 dendogramas apresentados há formação de 2 grupos distintos, sendo que na Figura 5a somente as amostras pertencentes à Passos foram agrupadas juntas (amostras 1 e 18) representando amostras da estação chuvosa e seca. As amostras 14 e 6 são da estação chuvosa de diferentes regiões (Arcos e Luminárias) com 100% de similaridade, apesar das amostras 17 e 7 apresentarem perfis idênticos foi possível verificar que estas amostras são de diferentes estações e diferentes locais (Passos e Luminárias). Já utilizando o primer 968f/1401r (Fig. 5b) foi possível verificar a distinção de grupos entre as amostras coletadas na estação seca e chuvosa, quatro amostras (12, 13, 14 e 15) de Arcos da estação chuvosa se agruparam com mais de 40% de similaridade. Na comunidade de fungos utilizando o primer NS3fGC/YM951r (Figura 6a) foi possível verificar dois grupos, o primeiro formado com as amostras 1 e 12 da estação seca de Passos e Luminárias, respectivamente. No segundo grupo as amostras 14, 28 e 26 se agruparam com menos de 20% de similaridade, as amostras de Arcos (14 e 28) de diferentes estações demonstraram perfis idênticos. Já as amostras (9, 11, 20, 22, e 23) de diferentes locais e diferentes estações também apresentaram 100% de similaridade e amostras (25, 27, 16 e 30) da estação seca foram idênticas de locais distintos. Utilizando-se o primer ITS1fGC/ITS4r (Figura 6b) foram agrupadas todas as amostras, exceto a amostra 1 (amostra da estação chuvosa de Passos). As amostras 18 e 21 são da estação seca de diferentes locais, no entanto apresentaram 100% de similaridade. Já as amostras de Arcos (12, 27 e 26) se agruparam também com 100% de similaridade, porém de diferentes estações,



um grande grupo (amostras 10, 11, 16 e 22) demonstram ser idênticos, entretanto são amostras de diferentes locais e estações (Tabela 3 e Figura 2b).

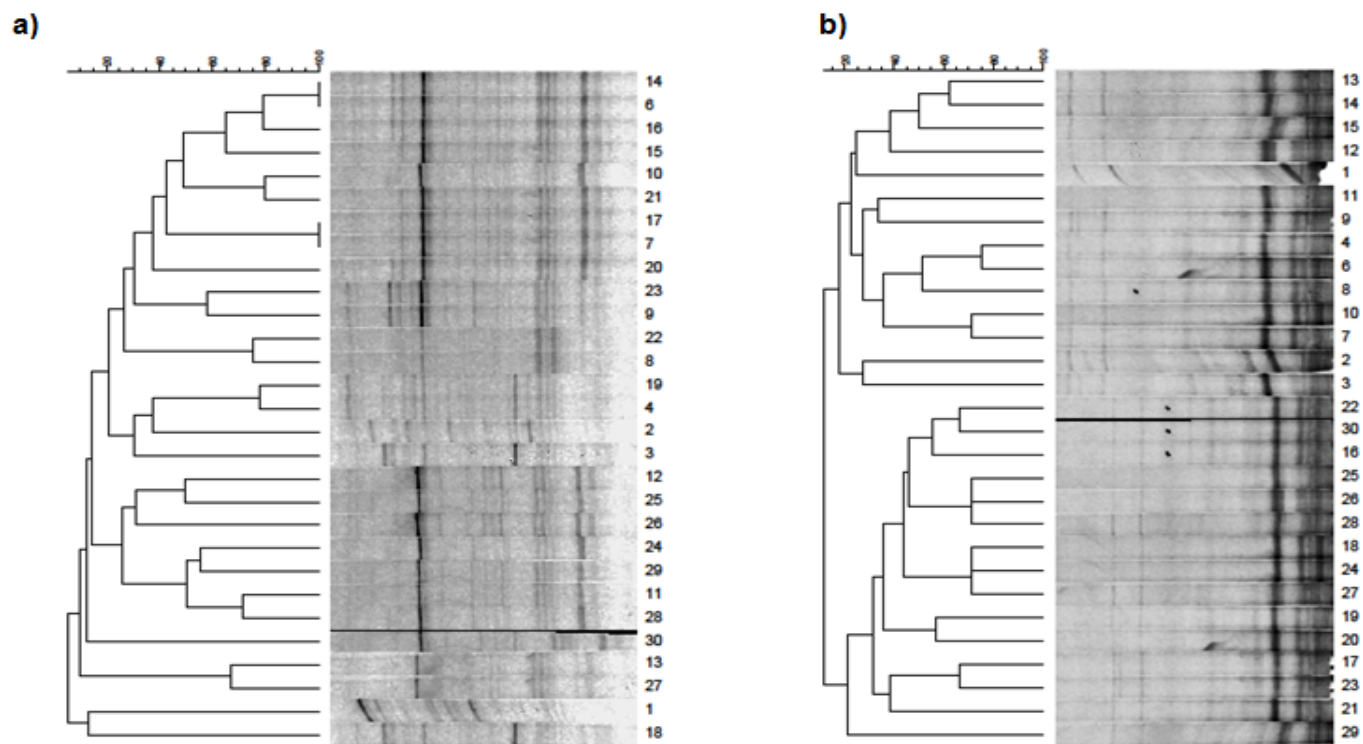


Figura 5 Análise de Clusters das bactérias. **a)** A análise de cluster dos amplicons da região V6-V8 do 16S rDNA presentes na amostra de solo do Cerrado brasileiro **b)** A análise de cluster dos amplicons da região V3 do 16S rDNA presentes em amostras de solo de Cerrado. Números: representam diferentes localidades: 1-4 região de Passos (estação chuvosa) e 16-20 (estação seca); 06-10 região de Luminárias (estação chuvosa) e 21-25 (estação seca); 11-15 região de Arcos (estação chuvosa) e 26 -30 (estação seca)

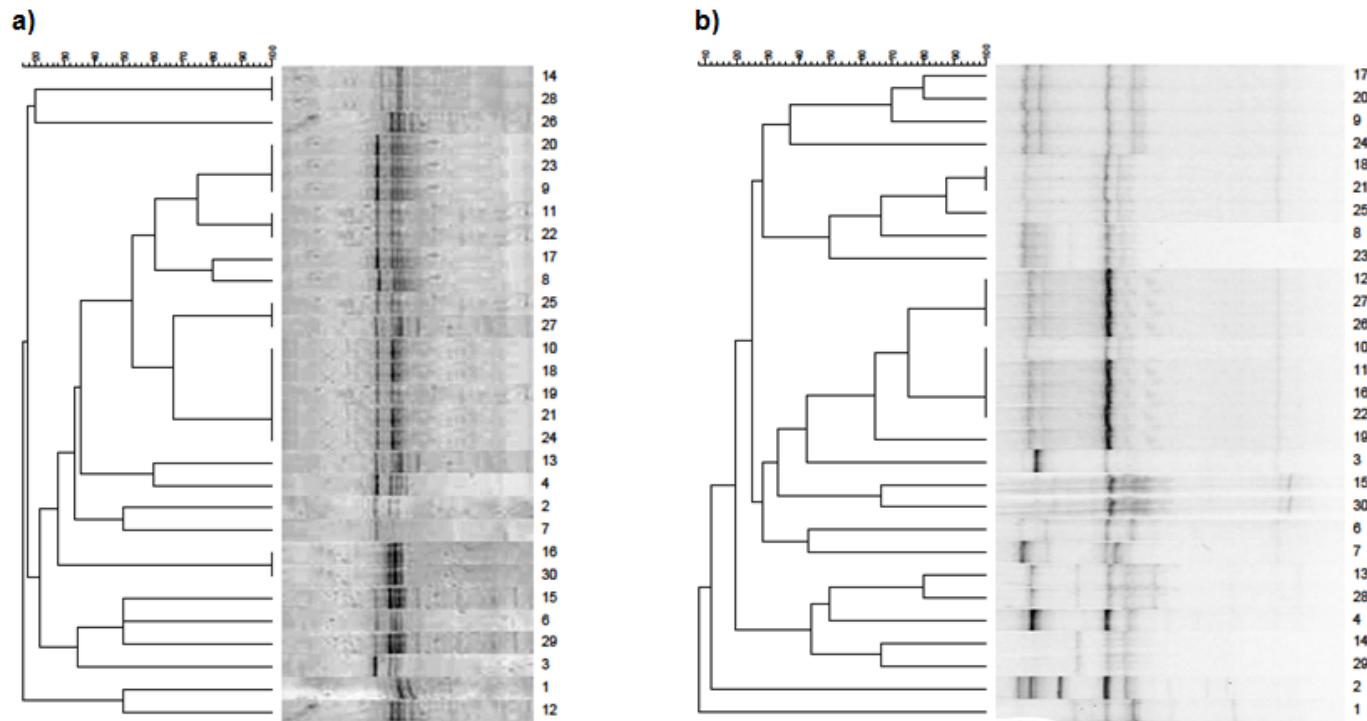


Figura 6 Análise de Clusters dos fungos. a) A análise de cluster dos amplicons região 18S rDNA presentes em amostras de solo de Cerrado b) A análise de clusters dos amplicons ITS rDNA presentes na amostra de solo do Cerrado brasileiro. Números: representam diferentes localidades: 1-4 região de Passos (estação chuvosa) e 16-20 (estação seca); 06-10 região de Luminárias (estação chuvosa) e 21-25 (estação seca); 11-15 região de Arcos (estação chuvosa) e 26 -30 (estação seca)

Tabela 3 Tabela sistemática para a análise das similaridades dos diferentes primers do dendograma composta por amostras de solo do Cerrado de Minas Gerais

<b>Primers</b>	<b>Amostras</b>	<b>Similaridades (%)</b>
	1 e 8	Menor que 20
338f/518r	6, 14, 15, 16; 7, 10, 21; 8, 17, 22; 4, 19; 11, 24, 28, 29; 13, 27	Maior que 60
	6 e 14	100
	7 e 17	100
968f/1401r	13 e 14; 4 e 6; 7 e 10; 22 e 30; 18, 25, 26, 28; 24 e 27; 19 e 20; 17 e 23	Maior que 60
	14 e 28; 9, 20 e 23; 11 e 22; 25 e 27; 10, 18, 19, 21 e 24	100
NS3fGC/	1 e 12	50
YM951r	14, 26 e 28	20
	3, 6, 15 e 29	35
ITS1fGC/	9, 17 e 20; 18, 21 e 25; 12, 26 e 27; 10, 11, 16 e 22; 15 e 30; 13 e 28; 14 e 29	Maior que 64
ITS4r	18 e 21; 12, 26 e 27; 10, 11, 16 e 22;	100

Os números se referem as diferentes localidades: 1-4 região de Passos (estação chuvosa) e 16-20 (estação seca); 06-10 região de Luminárias (estação chuvosa) e 21-25 (estação seca); 11-15 região de Arcos (estação chuvosa) e 26 -30 (estação seca)

### 3.3 Propriedades físico-químicas das amostras de solo do Cerrado mineiro

Neste trabalho foi possível observar pouca variação entre a microbiota da estação seca e chuvosa do solo do Cerrado. Assim os parâmetros pluviométricos do solo não apresentaram influência significativa na diversidade. Alguns microrganismos se caracterizaram por determinadas regiões amostradas demonstrando serem capazes de viver sob concentrações elevadas de K, Al, matéria orgânica, P e pH.

Observou-se que poucas características físico-químicas (K, AL e matéria orgânica) apresentaram diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ) entre as amostras analisadas (Tabela 4 e 5). Deste modo para caracterizar o solo de cada região amostrada foi realizado a análise multivariada (Gráfico 1). Cada eixo do gráfico apresenta o percentual de variação total entre os valores químicos sobre diferentes solos do Cerrado mineiro das estações chuvosa e seca, e variação entre os microrganismos encontrados e os locais amostrados da região de Passos, Luminárias e Arcos em diferentes estações do ano. Na análise dos componentes principais, os valores químicos e os diferentes locais amostrados na estação seca e chuvosa do solo do Cerrado mineiro foi possível observar que os componentes principais 1 e 2 explicaram juntos 79.08 % de variação (Gráfico 1a). A análise de componentes principais (PCA) mostrou que as amostras de Arcos da estação chuvosa foi caracterizada pelos teores de P (Fósforo), Ca (Cálcio) e matéria orgânica. Já as amostras de Arcos na estação seca se caracterizou pelos teores de Al (Alumínio) e K (Potássio). As amostras de Passos da estação seca se caracterizou pelos teores de Mg (magnésio), e da estação chuvosa pelo pH. As amostras de Luminárias tanto da estação chuvosa quanto da seca não apresentaram diferenças significativas entre os fatores físico-químicos. Na análise dos componentes principais, dos diferentes locais amostrados na estação seca e chuvosa do solo do Cerrado mineiro e os

microrganismos presentes em cada local foi possível observar que os componentes principais 1 e 2 explicaram juntos 77.61% de variação (Gráfico 1a). As leveduras *Zygosaccharomyces* sp., *Candida* sp., *Lachancea meyersii* e as bactérias *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cowanii*, *Klebsiella pneumoniae* foram encontradas em todos os locais amostrados, demonstrando que esta população é dominante nos solos do Cerrado mineiro. O fungo *Cladosporium* sp. caracteriza as estações chuvosa e seca de Arcos demonstrando ser predominante nesta região. Esta região foi caracterizada pelos fatores químicos do solo como Al, K, Ca, P e matéria orgânica, demonstrando que este microrganismo predomina em solos com estas características. Em solos do Cerrado o elemento de maior concentração é o Al que pode provocar efeitos tóxicos aos microrganismos, porém, estes mesmos podem excretar ácidos orgânicos para reduzir essa toxicidade (GILLER; WITTER; MCGRATH, 1998). Os elementos Ca, K e P atuam diretamente na solubilização do fosfato (SILVA; VIDOR, 2001). *Cladosporium oxysporum*, *Pantoea agglomerans* e *Bacillus macerans* caracterizaram as amostras da região de Passos na estação chuvosa, demonstrando que estes microrganismos são influenciados pelo pH, ou seja, preferem ambientes ácidos. As regiões de Luminárias (seca e chuvosa) e Passos (seca) demonstraram ser caracterizadas pelas bactérias *Escherichia coli* e *Enterobacter* sp. A bactéria ácido láctica *Leuconostoc mesenteroides* caracteriza a região de Arcos durante a estação chuvosa, esta bactéria demonstrou preferência pelo solo com maiores concentrações de Ca, Mg e P.

Tabela 4 Características químicas e físicas das amostras de solo de três diferentes regiões do Cerrado de Minas Gerais na estação chuvosa

Amostra	pH	P	K	Mg	Al	H+Al	Matéria orgânica	SB	Textura	
		mg/dm <sup>3</sup>		dag/Kg						
PA	Ponto 1	5.3±0.1a	1.5±0.1a	25±1a	0.1±0.0a	0.6±0.1a	3.6±0.1a	1.4±0.1a	0.3±0.1a	Arenoso
	Ponto 2	5.4±0.1a	1.5±0.1a	56±2a	0.1±0.0a	0.6±0.1a	4.5±0.1a	2.0±0.1a	0.4±0.1a	Médio
	Ponto 3	5.5±0.1a	1.2±0.1a	33±1a	0.2±0.0a	0.4±0.1a	2.6±0.1a	1.1±0.1a	0.3±0.1a	Médio
	Ponto 4	5.5±0.1a	1.0±0.1a	70±1b	0.1±0.0a	0.5±0.1a	3.6±0.1a	1.5±0.1a	0.5±0.1a	Médio
	Ponto 5	5.4±0.1a	0.7±0.1a	9±1b	0.1±0.0a	0.1±0.1a	1.7±0.1a	0.4±0.1b	0.2±0.1a	Médio
LU	Ponto 6	5.4±0.1a	1.2±0.1a	28±1a	0.2±0.0a	0.5±0.1a	7.9±0.1a	3.4±0.1a	0.3±0.1a	Argiloso
	Ponto 7	5.0±0.1a	1.5±0.1a	20±1a	0.1±0.0a	0.5±0.1a	7.9±0.1a	2.6±0.1a	0.3±0.1a	Argiloso
	Ponto 8	5.1±0.1a	1.2±0.1a	11±1b	0.2±0.0a	0.3±0.1a	2.6±0.1a	1.1±0.1a	0.2±0.1a	Arenoso
	Ponto 9	5.2±0.1a	2.0±0.1a	20±1a	0.1±0.0a	0.9±0.2a	7.0±0.1a	2.4±0.1a	0.3±0.1a	Médio
	Ponto 10	5.1±0.1a	1.5±0.1a	34±1a	0.1±0.0a	0.8±0.1a	8.8±0.3b	2.7±0.1a	0.3±0.1a	Argiloso
AC	Ponto 11	5.0±0.1a	1.2±0.1a	48±1a	0.1±0.0a	0.6±0.1a	4.0±0.1a	1.6±0.1a	0.7±0.1a	Argiloso
	Ponto 12	4.6±0.1a	0.7±0.1a	39±1a	0.1±0.0a	1.0±0.1a	6.3±0.1a	2.0±0.1a	0.3±0.1a	Argiloso
	Ponto 13	4.1±0.1a	1.8±0.1a	27±1a	0.3±0.0a	2.1±0.1b	15.3±1b	3.4±0.1a	0.3±0.1a	Argiloso
	Ponto 14	4.1±0.1a	1.8±0.1a	33±1a	0.1±0.0a	2.4±0.1b	17.1±2b	4.0±0.1a	0.3±0.1a	Argiloso
	Ponto 15	5.0±0.1a	1.8±0.1a	69±2b	0.1±0.0a	1.8±0.1b	12.3±1b	2.7±0.1a	0.4±0.1a	Argiloso

Os dados são valores duplicados médios ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas (P <0,05). PA - Passos; LU - Luminárias, AC - Arcos. K - Potássio; P - Fósforo; Al - Alumínio, Ca - Cálcio, Mg - Magnésio, H + Al - acidez potencial; SB - (cátions trocáveis) a soma de Ca, Mg, Na e K

Tabela 5 Características químicas e físicas das amostras de solo de três diferentes regiões do Cerrado de Minas Gerais na estação seca

Amostra	pH	P	K	Mg	Al	H+Al	Matéria orgânica	SB	Textura
		mg/dm <sup>3</sup>					dag/Kg		
PA	4.7±0.1a	1.7±0.1a	113.8±1b	0.1±0.0a	0.2±0.1a	13.7±0.1b	3.9±0.1a	0.5±0.1a	Arenoso
	5.1±0.1a	1.7±0.1a	88.9±1b	0.1±0.0a	0.4±0.1a	5.6±0.1a	2.4±0.1a	0.7±0.1a	Médio
	5.1±0.1a	1.4±0.1a	137.28±1b	0.1±0.0a	0.4±0.1a	4.5±0.1a	2.2±0.1a	0.8±0.1a	Médio
	5.1±0.1a	1.7±0.1a	117±1b	0.1±0.0a	0.5±0.1a	5.0±0.1a	1.9±0.1a	0.9±0.1a	Médio
	5.2±0.1a	1.4±0.1a	54±1b	0.1±0.0a	0.2±0.1a	4.5±0.1a	1.7±0.1a	0.4±0.1a	Médio
LU	5.1±0.1a	2.5±0.1a	37.4±1a	0.1±0.0a	0.6±0.1a	6.3±0.1a	2.2±0.1a	0.1±0.1a	Argiloso
	5.1±0.1a	0.9±0.1a	37.4±1a	0.1±0.0a	1.5±0.1b	7.0±0.1a	2.8±0.1a	0.2±0.1a	Argiloso
	5.2±0.1a	0.9±0.1a	39±1a	0.1±0.0a	0.7±0.1a	7.8±0.1a	2.8±0.1a	0.2±0.1a	Arenoso
	5±0.1a	1.2±0.1a	46±1a	0.1±0.0a	1.5±0.1b	10.9±0.1b	3.0±0.1a	0.3±0.1a	Médio
	5±0.1a	1.2±0.1a	67±1b	0.1±0.0a	1.4±0.1b	9.88±0.1b	3.1±0.1a	0.3±0.1a	Argiloso
AC	4.7±0.1a	2±0.1a	149.7±1b	0.1±0.0a	0.4±0.1a	8.7±0.1a	2.4±0.1a	1.3±0.1a	Argiloso
	4.8±0.1a	1.4±0.1a	48.3±1a	0.6±0.0a	0±0.1a	7.0±0.1a	1.8±0.1a	0.2±0.1a	Argiloso
	4.3±0.1a	1.4±0.1a	54.6±1a	0.1±0.0a	0.1±0.1a	15.3±1b	2.8±0.1a	0.3±0.1a	Argiloso
	4.2±0.1a	1.7±0.1a	39±1a	0.1±0.0a	0±0.1a	17.1±1b	3.0±0.1a	0.2±0.1a	Argiloso
	4.8±0.1a	1.2±0.1a	84.2±2b	0.1±0.0a	0.1±0.1a	10.9±1b	1.9±0.1a	0.4±0.1a	Argiloso

Os dados são valores duplicados médios ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas (P < 0,05). PA - Passos; LU - Luminárias, AC - Arcos. K - Potássio; P - Fósforo; Al - Alumínio, Ca - Cálcio, Mg - Magnésio, H + Al - acidez potencial; SB - (cátions trocáveis) a soma de Ca, Mg, Na e K



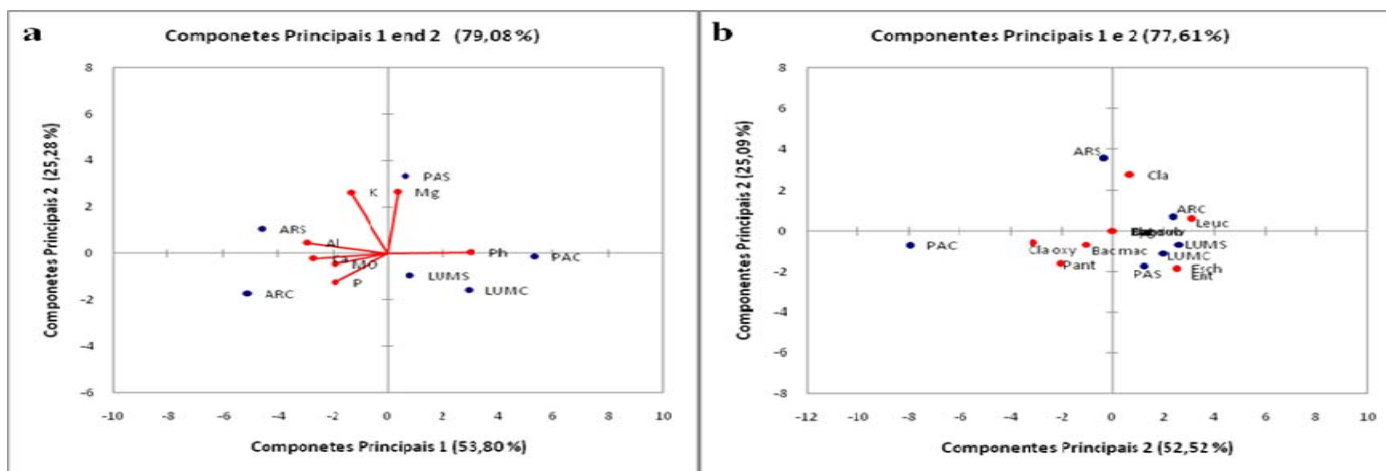


Gráfico 1 Análise dos componentes principais (PCA). a) Componentes principais das características químicas do solo do Cerrado de Minas Gerais. b) Componentes principais da microbiota dos solos amostrados das regiões de Passos, Arcos e Luminárias. Abreviaturas: K-Potássio; P-Fosforo; Al -Alumínio, Ca-Cálcio, Mg- Magnésio; PAC- Passos (estação chuvosa); PAS-Passos (estação seca); ARC-Arcos (estação chuvosa) ; ARS-Arcos (estação seca); LUMC-Luminárias (estação chuvosa); LUMS-Luminárias (estação seca); Zygo-*Zygosaccharomyces* sp.; Can-*Candida* sp.; Lac-*Lachancea meyersii* , Cla-*Cladosporium* sp.; Cla oxy-*Cladosporium oxysporum*; Bac mac-*Bacillus macerans*; Kle-*Klebsiella pneumoniae*; Ent cow - *Enterobacter cowanii*; Bac sub - *Bacillus subtilis*; Pant - *Pantoea agglomerans*; Esch - *Escherichia coli*; Ent - *Enterobacter* sp.; Leuc - *Leuconostoc mesenteroides*

#### 4 CONCLUSÕES

A partir da metodologia utilizada neste trabalho pode-se concluir que:

- a) o uso da técnica PCR-DGGE foi capaz de detectar a microbiota do solo dominante e não identificados por técnicas convencionais, como as bactérias do ácido láctico;
- b) as bactérias foram representadas pelas espécies *Bacillus macerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cowanii*, *Bacillus subtilis*, *Pantoea agglomerans*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Leuconostoc mesenteroides*;
- c) a comunidade fúngica foi representada por *Zygosaccharomyces* sp., *Candida* sp., *Lachancea meyersii*, *Cladosporium* sp.;
- d) a utilização de diferentes primers possibilitou identificar espécies diferentes em uma mesma amostra, detectando maior diversidade;
- e) a população microbiana foi semelhante quando comparada com os solos das três áreas analisadas das estações seca e chuvosa;
- f) os parâmetros físico-químicos não foram influentes na microbiota demonstrando que os microrganismos *Zygosaccharomyces* sp., *Candida* sp., *Lachancea meyersii*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cowanii* e *Klebsiella pneumoniae* foram dominante nos solos do Cerrado mineiro;
- g) este foi o primeiro estudo para caracterizar a comunidade microbiana presente nos solos do Cerrado do estado de Minas Gerais, sugerindo novos estudos para o conhecimento mais amplo sobre a diversidade da comunidade microbiana.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, Bougoure, v. 6, n. 11, p. 769-779, Dec. 2004.
- ASCHER, J. et al. World evaluation of the denaturing gradient gel electrophoresis apparatus as a parameter influencing soil microbial community fingerprinting. **Journal of Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 1721-1726, Sept. 2010.
- BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL. **BLAST assembled refseq genomes**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acesso em: 10 jul. 2010.
- BENSCH, K. et al. Species and ecological diversity within the Cladosporium cladosporioides complex (Davidiellaceae, Capnodiales). **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 67, n. 1, p. 1-94, June 2010.
- BRESOLIN, J. D. et al. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 391-403, Apr./June 2010.
- CASTRO, A. P. et al. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archieve Microbiology**, Paris, v. 190, n. 2, p. 129-139, 2008.
- DEEPA, C. K.; DASTAGER, S. G.; PANDEY, A. Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria from non-rhizospheric soil and their effect on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seedling growth. **World Journal Microbiology Biotechnology**, London, v. 26, n. 7, p. 1233-1240, July 2010.
- DEFELIPO, B. V.; RIBEIRO, A. C. **Análise química do solo: metodologia**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 1997. 26 p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de métodos de análise de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1997. 212 p.

FELL, J. W.; STATZELL-TALLMAN, A.; KURTZMAN, C. P. *Lachancea meyersii* sp. nov., an ascosporegenous yeast from mangrove regions in the Bahamas Islands. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 50, n. 2, p. 359-363, June 2004.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. Its primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 113-118, Apr. 1993.

GILLER, K. E.; WITTER, E.; MCGRATH, S. P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, Netherlands, v. 30, n. 10, p. 1389-1414, Sept. 1998.

GUCKER, B.; BOECHAT, I. G.; GIANI, A. Impacts of agricultural land use on ecosystem structure and whole-stream metabolism of tropical Cerrado streams. **Freshwater Biology**, Chicago, v. 54, n. 10, p. 2069-2085, Oct. 2009.

HOSHINO, Y. T.; MORIMOTO, S. Comparison of 18S primers for estimating fungal diversity in agricultural soils using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 54, n. 5, p. 701-710, Oct. 2008.

HYDE, K. D. et al. **Fungi in marine environments**. Hong Kong: Fungal Diversity, 2002. 395 p.

INIQUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 10, p. 1078-1085, Mar. 2004.

IZZO, A.; AGBOWO, J.; BRUNS, T. D. Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across: years in an old-growth mixed-conifer forest. **New Phytology**, Lancaster, v. 166, n. 2, p. 619-630, May 2005.

JIZHENG, H.; ZHIHONG, X.; JANE, H. Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes. **FEMS Microbial Letter**, Amsterdam, v. 247, n. 1, p. 91-100, June 2005.

KAWASAKI, H. et al. Screening for bacteria producing sucrose phosphorylase and characterization of the enzymes. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokyo, v. 60, n. 2, p. 319-321, Dec. 1996.

KIRK, J. L. et al. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 169-188, Aug. 2004.

LANYON, L. E.; HEALD, W. R. Magnesium, calcium and barium. In: \_\_\_\_\_. **Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties**. Madison: ASA, 1982. p. 247-260.

MAGALHÃES, K. T. et al. Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: evaluation of morphological and microbial variations. **Bioresource Technology**, Netherlands, v. 101, n. 22, p. 8843-8850, Nov. 2010.

MANTERA, D. K.; VIVANCO, J. M. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. **Journal of Microbiological Methods**, Netherlands, v. 71, n. 1, p. 7-14, Sept. 2007.

MUKHERJEE, I.; MITTAL, A. Bioremediation of endosulfan using *Aspergillus terreus* and *Cladosporium oxysporum*. **Environmental Contamination and Toxicology**, Berlin, v. 75, n. 5, p. 1034-1040, Nov. 2005.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 73, n. 1, p. 127-141, Oct. 1998.

NAKATSU, C. H. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 71, n. 1, p. 562-571, June 2007.

NÜBEL, U. et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 178, n. 19, p. 5636-5643, Oct. 1996.

PEIXOTO, R. S. et al. Decade of land use contributes to changes in chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 98, n. 3, p. 403-413, May 2010.

QUIRINO, B. et al. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiology Research**, New York, v. 164, n. 1, p. 59-70, Jan. 2009.

RODRIGUES, W. Valoração econômica dos impactos ambientais de tecnologias de plantio em região de Cerrados. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 135-153, jun. 2005.

SARTORI, V. C.; VALDEBENITO, R. M. S.; RIBEIRO, R. T. S. Desenvolvimento de *Pantoea agglomerans* em diversas temperaturas, pH e concentrações de carboxi-metil-celulose e o seu impacto no controle de *Rosellinia necatrix*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, p. 13-17, ago. 2008.

SCHWARZENBACH, K.; ENKERLI, J.; WIDMER, F. Objective criteria to assess representatively of soil fungal community profiles. **Journal Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 68, n. 2, p. 358-366, Nov. 2007.

SEKIGUCHI, H. et al. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gel electrophoresis analyses. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 23, n. 2, p. 1205-1208, May 2001.

SILVA, G. N. F.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, dez. 2001.

TOLEDO, L. de O. et al. Análise multivariada de atributos pedológicos e fitossociológicos aplicada na caracterização de ambientes de Cerrado no norte de Minas Gerais. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 5, p. 957-968, jun. 2009.

VITAL, M. J. S. et al. Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá ecological station, Roraima-Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 230-235, jul./set. 2002.

WALLIS, P. D. et al. Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. **Applied Soil Ecology**, Netherlands, v. 46, n. 1, p. 147-150, Sept. 2010.

WANG, L. et al. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Oxford, v. 57, n. 8, p. 1846-1850, Jan. 2007.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Ed.). **PCR protocols: guide to methods and applications**. San Diego: Academic, 1990. p. 315-322.

YANAGIDA, F.; CHEN, Y.; SHINOHARA, T. Searching for bacteriocin producing lactic acid bacteria in soil. **Journal Genetic Applied Microbiology**, London, v. 52, n. 1, p. 21-28, Feb. 2006.