

Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças¹

Diversity of bacteria of the soil under natural vegetation and vegetables cropping

Silvana Pompéia Val-Moraes^{2*}, Maria José Valarini³, Raquel Ghini⁴, Eliana Gertrudes de Macedo Lemos⁵ e Lúcia Maria Carareto-Alves⁶

Resumo - Os microrganismos do solo são componentes essenciais na manutenção do equilíbrio físico-químico e biológico do mesmo e exercem importante função que inclui a degradação de resíduos de plantas e animais e a liberação de nutrientes na cadeia alimentar. Este trabalho teve como objetivo comparar a microbiota de um solo com cobertura de mata (SMS) e outro cultivado com hortaliças (SHC), supressivos ou não a *Rhizoctonia solani*. Foram feitas extrações do DNA total dos solos e a partir dos mesmos, amplificação por PCR dos genes 16S rDNA, clonagem dos fragmentos e seqüenciamento dos genes do RNA ribossomal. A análise dos resultados demonstrou que essa metodologia foi eficiente para avaliação de bactérias. No solo supressivo de mata os filos mais encontrados pertencem aos das Acidobactérias, Verrucomicrobia e Actinobactérias e no solo conducente cultivado com hortaliças a maioria pertence aos filos das Proteobactérias, Firmicutes e Bacteroidetes.

Palavras-chave - Solo conducente. Solo supressivo. Metagenoma. *Rhizoctonia solani*.

Abstract - The microorganisms are essential components in the maintenance of the biological and physicochemical balance of the soil. They exert important function including the degradation of residues of plants and animals and the release of nutrients in the alimentary chain. This work had as objective to compare the microbiota of a soil under bush covering (SMS) and other cropped with vegetables (SHC), suppressive or not it *Rhizoctonia solani*. Total microbial community DNA was extracted of soils, amplification for PCR of the genes 16S rDNA, inserted into pGEM®-T cloning vector and sequencing of the genes of the ribosomal RNA. The analysis of the results demonstrated that this methodology was efficient for evaluation of bacteria in ground. In the bush soil suppressive the microorganisms more found belonged to the phyla of the Acidobacterias, Verrucomicrobia and Actinobacterias and in the soil cultivated with vegetables the biggest frequency was of organisms pertaining to the phyla of the Proteobacterias, Firmicutes and Bacteroidetes.

Key words - Conducive soil. Suppressive soil. Metagenome. *Rhizoctonia solani*.

* Autor para correspondência

¹Recebido para publicação em 28/11/2007; aprovado em 20/11/2008

²Projeto financiado pela FAPESP/CAPES e parte da dissertação da primeira autora, 2003, FCAV/UNESP
Bióloga, Pós-doutoranda – Universitat de Barcelona-UB, Barcelona, ES, FCAV/UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n – Jaboticabal – São Paulo – CEP: 14. 884-900, valmoraes.silvana@gmail.com

³Eng. Agrônomo, Pesquisadora - Instituto de Zootecnia, APTA - SAASP, mjvalarini@iz.sp.gov.br

⁴Eng. Agrônomo, Pesquisadora - Embrapa Meio Ambiente, raquel@cnpmembrapa.br

⁵Bióloga, Profa. Dra. FCAV/UNESP, egerle@fcav.unesp.br

⁶Bióloga, Profa. Dra. FCAV/UNESP, lmalves@fcav.unesp.br

Introdução

A sustentabilidade dos solos é ameaçada pela degradação sendo os distúrbios nas comunidades vegetais os primeiros sintomas visíveis, porém, frequentemente a desertificação de áreas é acompanhada ou precedida pela perda das propriedades físico-químicas, biológicas e microbiológicas dos solos (REQUENA et al., 2001). Em relação às propriedades do solo a umidade (SAIT et al., 2006), o pH e a quantidade de fósforo disponível podem interferir na comunidade bacteriana (LINDSTRÖM et al., 2004; RODRIGUES; FRAGA, 1999). O pH do solo interfere diretamente na frequência de Acidobactérias e a umidade do solo favorece as Verrucomicrobia (SAIT et al., 2006).

Tão importantes quanto às características físico-químicas do solo são os seus componentes biológicos, ou seja, a diversidade genotípica e a atividade metabólica dos microrganismos edáficos. Portanto, a recuperação quantitativa e qualitativa de microrganismos a partir de amostras ambientais é essencial para entender a função do ecossistema (TAYLOR et al., 2002).

A diversidade de microrganismos no solo é muito maior do que se imaginava, no entanto, devido as grandes alterações realizadas pelas práticas agrícolas essa diversidade pode ser perdida antes mesmo de tornar-se conhecida (CURTIS et al., 2002). Ainda não existe uma metodologia universal capaz de cultivar e caracterizar a maioria das bactérias presentes nos ecossistemas naturais (RONDON et al., 1999a).

No entanto, com a utilização da metagenômica existe a possibilidade de acessar os genes de bactérias de um determinado ambiente independente de técnicas de cultivo, através da extração de DNA diretamente do solo com a construção de uma biblioteca metagenômica com este genoma misto (PACE, 1997). Consequentemente pode haver uma probabilidade de se conhecer mais rapidamente a comunidade bacteriana local com a possibilidade de se explorar novos recursos microbianos (RONDON et al., 1999b, 2000).

O Domínio Bactéria há uma década compreendia segundo Hugenholtz et al. (1998a, 1998b), 36 divisões incluindo 12 divisões baseadas em seqüências 16S rRNA de organismos cultivados descritas por Woese (1987), e outras 12 divisões baseadas somente na análise de seqüências do gene 16S rDNA isoladas diretamente do meio ambiente (HUGENHOLTZ et al., 1998a), o que indicava a possibilidade de se identificar por métodos moleculares outros filos não cultiváveis (WARD et al., 2003). Baseado em seqüência do 16S rRNA estão descritas 53 divisões sendo que somente 27 são cultiváveis (KELLER; ZENGLER, 2004), o que ressalta a importância da utilização de técnicas moleculares.

Para caracterização genética de bactérias, têm sido utilizado os ácidos ribonucléicos ribossômicos (rRNA), pois seus genes codificadores, o rDNA, apresenta alto grau de conservação (PEREIRA et al., 2006; SILVEIRA et al., 2006). Segundo, Silveira et al. (2006), o que possibilita identificar vários representantes das comunidades bacterianas com alguns gramas de solo. Alguns dos filos mais estudados indicam a importância dos microrganismos edáficos para a preservação do solo (CANHOS 1997; HEDLUNG, 1997; HUGENHOLTZ et al., 1998b; RODRIGUES; FRAGA, 1999; RONDON et al., 1999b;), têm alto potencial industrial, entretanto, muitos filos ainda são pouco estudados (BEER et al., 2002; LIU et al., 2001; STACKEBRANDT et al., 1997).

O presente trabalho teve como objetivo comparar os principais grupos de bactérias dos solos com cobertura de mata nativa e em solo cultivado com hortaliças, através de metodologias de metagenômica.

Material e métodos

A coleta do solo supressivo foi realizada em uma mata situada na microbacia do Córrego Taquara Branca, município de Sumaré (22° 49' 13" S; 47° 16' 08" W), no estado de São Paulo e a supressividade dos solos foi avaliada pelo método do crescimento do patógeno (*Rhizoctonia solani*) nas amostras de solo segundo Ghini; Zaroni (2001). O solo conducente com cultivo comercial de hortaliças foi coletado na mesma microbacia. A coleta seguiu o seguinte procedimento: doze amostras simples ao acaso coletado em zigue e zague com profundidade de 0 - 20 cm que depois de reunidas e homogeneizadas, resultaram em amostra composta. As análises dos solos foram realizadas no Departamento de Solos e Adubos da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, como pode ser observado na Tabela 1.

As análises químicas de macronutrientes; micronutrientes, e granulométrica com fracionamento de areia foram efetuadas de acordo com o Programa de Controle de Qualidade Análise de Solo - Sistema IAC. (RAIJ et al., 2001).

Para a extração do DNA das comunidades microbianas de cada solo (DNA metagenômico) foi utilizado o Kit FastDNA[®] Spin Kit for Soil (Bio 101 - catalog #6560-200). O DNA metagenômico foi usado em cadeia da polimease de PCR para a amplificação do gene 16S rRNA, utilizando oligonucleotídeos específicos pA (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') e pc5B (5'-TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). As reações de PCRs, sequenciamento e análise dos amplicons foram feitas segundo metodologia descrita por Pereira et al. (2006) e Silveira et al. (2006).

Tabela 1 - Características químicas e físicas dos solos cultivado com hortaliças (SHC) e solo de mata (SMS).

Características	Solo Supressivo de Mata	Solo Conducente
		Hortaliças
pH (CaCl ₂)	4,8	5,6
matéria orgânica (g dmn ⁻³)	50,0	56,0
P (mg dm ⁻³)	14,0	280,0
K (mmol _c dm ⁻³)	1,6	5,0
Ca (mmol _c dm ⁻³)	31,0	83,0
Mg (mmol _c dm ⁻³)	12,0	15,0
H + Al (mmol _c dm ⁻³)	52,0	31,0
SB	44,6	103,0
T	96,6	134,0
V%	46,0	77,0
B (mg dm ⁻³)	0,62	0,38
Cu (mg dm ⁻³)	3,8	10,0
Fe (mg dm ⁻³)	89,0	60,0
Mn (mg dm ⁻³)	35,7	34,3
Zn (mg dm ⁻³)	3,4	4,8
Argila	480,0	400,0
Limo	150,0	220,0
A. M. F (Areia muito fina) g kg ⁻¹	50,0	80,0
A. F. (Areia fina) g kg ⁻¹	200,0	210,0
A. M. (Areia média) g kg ⁻¹	90,0	80,0
A. G. (Areia grossa) g kg ⁻¹	30,0	10,0
A. M. G. (Areia muito grossa) g kg ⁻¹	0,0	0,0
Total areia	370,0	380,0
Classe Textural	Argilosa	Argilosa

As seqüências foram analisadas inicialmente com os programas “Sequencing Analysis 3.4” e “Phred/Phrap/Consed” (GORDON et al., 1998). Com o auxílio do programa Contgen foram selecionados as seqüências com mais de 400 bases e com qualidade Phred acima de 20. Essas seqüências foram comparadas com seqüências do GenBank utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997).

O alinhamento das seqüências de DNA foi feito com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 2001) e para a construção da matriz de similaridade foi usado o algoritmo p-distance, com bootstrap de 3.000 repetições (SWOFFORD et al., 1996). O método de distância “neighbor-joining” (SAITOU; NEI, 1987) foi usado na construção das árvores filogenéticas e para a visualização gráfica das árvores foi utilizado o programa MEGA (versão 2.1) (KUMAR et al., 2001).

A diversidade genética foi calculada usando as seqüências de DNA dos dois solos. Os valores da distância genética foram calculados entre grupos de diferentes solos e entre grupos de microrganismos obtidos do mesmo solo. A distância genética entre os indivíduos do mesmo grupo foi estimada pela média aritmética de todas as distâncias de bases, e a distância genética entre grupos foi estimada pelo modelo distâncias de bases entre dois grupos (NEI; KUMAR, 2000). Estes valores foram calculados usando a p-distância o método de distância “neighbor-joining” (SAITOU; NEI, 1987) usando o software MEGA (2.1 versão) (KUMAR et al., 2001). A estimativa das distâncias genéticas foi usada para avaliar a divergência genética dentro e entre os grupos (NEI, 1972). O software Arlequin foi usado para estimar a estrutura genética entre diferentes grupos de solos e da diversidade genética intra-específica. O significado das diferenças de bases em valores do índice de fixação (FST) que determinam a média da diferenças

de bases e de outros índices usados para verificar se os grupos de microrganismos dos diferentes solos estavam estruturados, e as diferenças da média entre grupos de microrganismos foram calculadas usando a análise da variação molecular (AMOVA). O teste de FST foi usado para comparar a diversidade genética dentro de cada grupo à diversidade genética total combinada concordando a equação do $F_{ST} = (\theta_T - \theta_W) / \theta_T$, onde θ_T é a diversidade genética para todas as amostras e θ_W é a diversidade genética em cada grupo (MARTIN, 2002). O significado estatístico de FST foi avaliado aleatoriamente atribuindo seqüências às populações e calculando o FST para 3000 permutações. A média das diferenças de bases foram estimadas e comparadas dentro de um grupo do número de diferenças da seqüência entre um solo e outro (SCHNEIDER et al., 2000). Para estimar a diversidade genética dentro dos dois solos os índices foram calculados usando o método de distância com modelo de substituição do nucleotídeo $p_{\text{distância}}$. A média das diferenças de bases e a diversidade do nucleotídeo foram calculadas para cada solo. Também os índices moleculares como o número de cópias do gene e os haplótipos, o número total de loci, os loci válidos, os locais polimórficos e a diversidade de nucleotídeos foram calculados para cada série de dados.

As seqüências do gene 16S rRNA foram depositadas e estão disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através dos números de acesso que constam nos relacionamentos filogenéticos deste trabalho.

Resultados e discussão

Nos estudos da diversidade bacteriana do SMS foram obtidas 98 seqüências válidas considerando mais de 400 bases com qualidade $Pr_{hap} > 20$, “score” > 120 e “evaluate” -30 . Das seqüências obtidas 29% apresentaram homologia com seqüências que se encontravam depositadas no GenBank como “environmental samples”; ou seja, não apresentaram homologia com nenhum filo bacteriano; outras 3,6% pertenciam ao filo Firmicutes; 3,6% Verrucomicrobia; 1,8% Proteobactéria; 12,8% Actinobactéria; 3,6% Planctomycetes; 1,8% TM6; 1,8% Bacteroidetes e 18,2% Acidobactérias. A partir da árvore filogenética foi possível agrupar e caracterizar a maior parte dos organismos que não apresentavam homologia com nenhum filo.

Nos estudos da diversidade bacteriana do SHC foram obtidas 96 seqüências válidas e 50% apresentaram homologia com seqüências que estavam depositadas no GenBank sem classificação alguma (62,8%), já as Firmicutes representavam 15,7%; Chloroflexi 4,3%;

Acidobactérias 1,4%; Actinobactéria 4,3%; Cyanobactéria 1,4%; Proteobactéria 7,2%. A partir da árvore filogenética também foi possível agrupar e caracterizar a maior parte dos organismos que não apresentavam homologia com nenhum filo.

Neste trabalho foi através das análises das árvores filogenéticas que se pôde determinar em qual grupo os organismos não identificados pertenciam e estimar quais os grupos mais abundantes observados em cada solo estudado, deste modo foi feita uma análise dos principais grupos encontrados no solo supressivo de mata e no solo cultivado com hortaliças (Figura 1 e 2).

No entanto, nos respectivos solos, pôde-se observar que alguns microrganismos não classificados não se agruparam a nenhum filo bacteriano, 9,1% SMS e 14,3% SHC. A maioria dos trabalhos envolvendo estimativas de diversidade de bactérias nos solos relata diferentes quantidades de microrganismos que não podem ser agrupados a nenhum filo conhecido, independentemente das técnicas de análise utilizadas, o que indica a possibilidade de serem novos filos incultiváveis pertencentes ao Domínio Bactéria (WARD, 2003).

As Chloroflexi foram encontradas somente no SHC e as Planctomycetes somente no SMS, esses têm sido os filos bacterianos menos estudados (BEER et al. 2002; LIU et al., 2001).

Das bactérias observadas no solo supressivo de mata temos como mais freqüentes as Acidobactérias, Actinobactérias, Verrucomicrobia. Analisando a distribuição dos clones nos diferentes filos observou-se que a grande maioria das seqüências na biblioteca SMS 23,7%, foram agrupadas ao filo Acidobactéria. A ocorrência desse filo está diretamente relacionada com o pH do solo (SAIT et al., 2006). Havia mesmo a expectativa de se encontrar uma porcentagem maior deste filo, pois o solo desta área apresentava um pH mais ácido (Tabela 1).

As Acidobactérias foram reconhecidas como filo há cerca de uma década e a ocorrência de seqüências desse organismo em diversos estudos ambientais sugere que estes microrganismos são componentes ecológicos significativos em diversos ecossistemas, particularmente em comunidades de solo (HUGENHOLTZ et al., 1998b).

Proposto em 1997, por Hedlund e colaboradores, o filo Verrucomicrobia possui representantes amplamente distribuídos na natureza, principalmente no solo. Vários trabalhos relatam à presença desse filo em solos de floresta, cultivados e solos áridos, em diferentes lugares do mundo (BORNEMAN et al., 1996; DUNBAR et al., 1999; RONDON et al., 1999). Este filo tem atualmente dois gêneros e cinco espécies conhecidas, são exclusivamente anaeróbios, sendo a maioria dos isolados foi encontrada em ambientes aquáticos (RAPPÉ; GIOVANNONI, 2003).



Figura 1 - Relacionamento filogenético baseado na amplificação da região 16S rDNA através de PCR de amostras do solo SMS, a árvore foi enraizada com a seqüência de Archaea

Lindström et al. (2004) investigaram os fatores que afetam a composição de bacterioplâncton em diferentes profundidades, em um lago na Suécia com diferentes tratamentos de fósforo (P), e concluíram a alta disponibilidade desse composto favoreceu a população deste grupo. No entanto, neste trabalho foi observado que a quantidade de fósforo disponível no SHC era de 95% a mais do que no SMS (Tabela 1), e sugere que outros componentes podem interferir e favorecer a existência do filo, pois não foram obtidos nenhum representante do mesmo no SHC. É possível associar a grande frequência de Verrucomicrobia à temperatura do solo, por se tratar de solo de mata está sempre protegido pela vegetação mantendo assim uma temperatura mais estável em relação a um solo cultivado (SAIT et al., 2006).

As Actinobactérias são Gram-positivas com alto Teor de G + C, compreende o grupo dos organismos da família Actinomycetales e gêneros relacionados (STACKEBRANDT et al., 1997). O grupo Actinobacteria é considerado muito importante, devido a sua característica de produção de diversos antibióticos e deste modo podem controlar diversos grupos bacterianos e, provavelmente, tem um papel importante no SMS. Nesse solo houve a ocorrência de uma nova divisão TM6, que só pôde ser conhecida graças às técnicas moleculares (KELLER; ZENGLER, 2004).

No SHC a maior frequência de bactérias foi do grupo Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobactérias. As Firmicutes são bactérias Gram-positivas com baixo teor de G + C e são separadas em dois grandes grupos filogeneticamente distintos, cujos organismos podem ser, de maneira geral, discriminados de acordo com o teor de guanina e citosina (G + C) no DNA. O gênero *Bacillus* pertencente a esse filo foi descrito como bactérias com grande potencial de solubilização de fósforo nos solos (RODRIGUES; FRAGA, 1999). O grande número de representantes desse filo pode estar diretamente ligado à alta concentração de fósforo encontrado no SHC (Tabela 1).

Já as Proteobactérias apresentam grande diversidade de morfologia celular e fisiologia. As estratégias para obtenção de energia são várias, incluindo organismos com metabolismos quimiolitotrófico, quimiorganotrófico e fototrófico, além de outras vias metabólicas especializadas em organismos adaptados a nichos diversos (CANHOS et al., 1997). Conforme descrito por Requena (2001) que alterações nos solos ameaçam a sustentabilidade ocorrendo distúrbios nas comunidades vegetais, também altera as comunidades bacterianas.

Maiores esforços para ampliar o conhecimento sobre a diversidade microbiana e filogenia de microrganismos

são fundamentais para a exploração de novos organismos de interesse ambiental e industrial.

O índice de diferenciação genética entre as duas comunidades bacterianas (SMS e SHC), calculado por Fst foi significativa (Fst=0,03157, para P<0,05), sugerindo que valor relativamente baixo seja porque as duas comunidades são estruturalmente distintas. Um dado interessante foi à existência de uma maior diversidade genética individual e também entre as comunidades estudadas. Os resultados da variação genética intra-populacional calculados pelo teste AMOVA apresentaram uma média de 96,84, ou seja, há uma grande variabilidade de organismos dentro de uma mesma comunidade. Resultado semelhante foi obtido por Silveira et al. (2006) analisando microrganismos do solo sob arboreto de *Eucalyptus sp.*

O software Arlequin analisou 2.143 pares de bases de cada clone em ambos os solos calculando também a média das diferenças entre pares de bases, valores que foram de 98,17 e 364,78 para as bibliotecas SMS e SHC, respectivamente. Já o número de nucleotídeos polimórficos apresentou valores de 677 e 2.143 nas bibliotecas SMS e SHC, respectivamente. Estes valores indicam a existência de uma maior diversidade genética na área SHC em relação ao SMS.

O SMS foi considerado como um solo sob vegetação natural, sem trato cultural, que apresenta comunidades bacterianas mais adaptadas ao meio ambiente, ou seja, um sinergismo maior e diversidade menor quando comparada com área sob cultivo de hortaliças, entretanto, com esse plantio o ecossistema sofreu uma alteração, aumentando a sua dinâmica populacional e conseqüentemente o aumento da diversidade bacteriana.

A distância genética entre o SMS e o SHC apresentou o valor intermediário (0,361). Em relação aos filios a distância genética mais baixa dentro dos grupos foi observada para Verrucomicrobia-SMS (0,093), e o mais elevado para Firmicutes-SHC (0,458), os outros grupos apresentaram distâncias intermediárias, destacando-se para Acidobactéria SMS (0,176) e Proteobactéria SHC (0,305) (Tabela 2A; 2B; 2C).

Podemos observar na Tabela 1 que o solo SMS apresentou baixo teor de nutrientes disponíveis quando comparados com o solo SHC, fazendo uma relação entre a quantidade de Acidobactérias encontradas essas foram maiores em relação ao SHC, já no SHC a quantidade de Proteobactérias foi mais expressiva. Resultados semelhantes foram observados por Smit et al. (2001) sugerindo que a razão entre o número de Proteobactéria e Acidobactéria serve como indicativo da condição nutricional do solo, considerando as Proteobactérias com alto potencial de crescimento e as Acidobactérias com baixo potencial de crescimento, mas com alta capacidade de competir por substratos.

Tabela 2 - Distância genética dentro dos grupos de solos e de Filos

A. Solo	Distância genética dentro dos solos	
SMS	0,245	
SHC	0,361	
B. Solo	SMS	SHC
SMS	0,312	
SHC	0,312	
C. Filo	Distância genética dentro dos Filos	
1-Firmicutes-SMS	0,426	
2-sem classificação-SMS	0,356	
3-Acidobactéria-SMS	0,176	
4-TM6-SMS	0,179	
5-Verrucomicrobia-SMS	0,093	
6-Actinobactéria-SMS	0,167	
7-Proteobactéria-SMS	0,137	
8-Bacteroidetes-SMS	n/c	
9-Planctomycetes-SMS	0,299	
10-Bacteroidetes-SHC	0,224	
11-sem classificação-SHC	0,365	
12-Acidobactéria-SHC	n/c	
13-Proteobactéria-SHC	0,305	
14-Firmicutes-SHC	0,458	
15-Actinobactéria-SHC	0,118	
16-Chloroflexi-SHC	0,355	
17-Cyanobactérias-SHC	n/c	

Com o índice de fixação (FST), que calcula a média da diferenças de bases e de outros índices, podemos verificar que a estrutura da população dos solos foi afetada pelo cultivo, com o impacto principal causado pela cultura de hortaliças o valor elevado de FST, 0,03157 (Tabela 3B). A diversidade genética mais elevada foi distribuída dentro dos grupos (96,84) e uma parcela menor entre os grupos foi de (3,16) (Tabela 3A).

A média das diferenças de bases e o número de locais polimórficos para o solo do SHC apresentam os valores mais elevados (Tabela 3C), indicando que este solo foi muito impactado pela cultura. O solo SMS que tem menos haplótipos representados por mais de uma seqüência (98 seqüências e 55 haplótipos) já no solo SHC (96 seqüências e 70 haplótipos).

Tabela 3 - Distância genética entre os solos e valores da diversidade

A. Solo	Soma dos quadrados	Varição da porcentagem
Entre as populações	2,018	3,16
Dentro das populações	92,949	96,84
B. Solo	SMS	SHC
SMS	0,00000	
SHC	0,03157	0,00000
FST	0,06157	
C. Índice	SMS	SHC
Seqüências usadas	98	96
Haplótipos	55	70
Haplótipos compartilhados	0	0
Total de loci	2.143	2.143
Loci polimórficos	677	2.143
Diversidade de nucleotídeos	0,9472 +/- 0,0165	0,9897 +/- 0,0038
Distância média de bases	171,690933 +/- 0,252487	364,78885522 +/- 0,170222

Conclusão

A metodologia foi eficiente para identificar as comunidades bacterianas presentes nos solos e a ocorrência de várias seqüências que não foram agrupadas a nenhum filo, sugere as existências de novos filios.

Referências

- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation to protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- BEER, M. et al. Phylogenic of the filamentous bacterium Eikelboom type 1851, and design and application of a 16S rRNA targeted oligonucleotide for its in situ identification in activated sludge. **FEMS Microbiology Letters**, v. 207, n. 02, p. 179-183, 2002.
- BORNEMAN, J.; SCKROCH, P. W.; O' SULLIVAN, K. M. Molecular Microbial diversity of an Agricultural Soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 06, p.1933-1943, 1996.

- CANHOS, V. P. et al. Diversidade no domínio bactéria. In: JOLY, C. A.; BICUDO, C. E. M. (orgs). **Biodiversidade do estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. 1 Microorganismos & Vírus. São Paulo: FAPESP, 1997. p.1-13. 1 v.
- CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T.; SCANNELL, J. W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 99, n. 16, p. 10494-10499, 2002.
- DUNBAR, J.; TAKALA, S.; BARNS, S. M. Levels of Bacterial Community Diversity in Four Arid Soils Compared by Cultivation and 16S rRNA Gene Cloning. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 04, p. 1662-1669, 1999.
- GHINI, R.; ZARONI, M. M. H. Relação entre coberturas vegetais e supressividade de solos a *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 01, p. 10-15, 2001.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, n. 01, p.195-202, 1998.
- HALL, P. **BioEdit version 5.0.6**: Biological sequence alignment editor for windows 95/98/NT Raleigh. North Carolina State University, 2001. Disponível em: <<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.htm>>. Acesso em: 28 out. 2007
- HEDLUND, B. P.; GOSINK, J.; STALEY, J. T. Verrucomicrobia a new division of the Bacterial containing three new species of Prosthecobacter. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 72, n. 01, p. 29-38, 1997.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 18, p. 4765-4774, 1998a.
- HUGENHOLTZ, P.; PITULLE, K. L.; PACE, N. R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 02, p. 366-376, 1998b.
- KELLER, M.; ZENGLER, K. Tapping into microbial diversity. **Nature Review Microbiology**, v. 02, n. 02, p.141-150, 2004.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. Mega2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v. 17, n. 12, p. 1244-1245, 2001.
- LINDSTRÖM, E. S.; VREDE, K.; LESKINEN, E. Response of a member of the Verrucomicrobia, among the dominating bacteria in a hypolimnion, to increased phosphorus availability. **Journal of Plankton Research**, v. 26, n. 02, p. 241-246, 2004.
- LIU, J. R. et al. Phylogenic of the filamentous bacterium 'Nostocoida limicola' III from activated sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 195-202, 2001.
- MARTIN, A. P. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 08, p. 3673-3682, 2002.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.
- NEI, M.; KUMAR, S. (Eds.). **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford: Oxford University Press, 2000.
- PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, n. 5313, p. 734-740, 1997.
- PEREIRA, R. M. et al. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 04, p. 439-447, 2006.
- RAIJ, B. V. et al. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. São Paulo: Instituto Agrônomo. 2001, 284p.
- RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 369-394, 2003.
- REQUENA, N. et al. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 02, p. 495-498, 2001.
- RODRIGUES, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 04-05, p. 319-339, 1999.
- RONDON, M. R., GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. The earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. **Trends Biotechnology**, v. 17, p. 403-409, 1999a.
- RONDON, M. R. et al. Functional genomics in bacteria: analyses of gene expression in *Escherichia coli* from a bacterial artificial chromosome library of *Bacillus cereus*. **Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America**, v. 96, p. 6451-6455, 1999b.
- RONDON, M. R. et al. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 06, p. 2541-2547, 2000.
- SAIT, M.; DAVIS, K. E. R.; JANSSEN, P. H. Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision I of the phylum Acidobacteria occurring in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 03, p. 1852-1857, 2006.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution**, v. 04, n. 04, p. 406-425, 1987.
- SCHNEIDER, S. D.; FURLONG, M. A.; EXCOFFIER, L. **Arlequin version 2.000**: a software for population genetics data analysis. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 2000.
- SILVEIRA, E. L. et al. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 10, p.1507-1516, 2006.
- SMIT, E. et al. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 05, p. 2284-2291, 2001.
- STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system,

Actionobacteria classis nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 02, p. 479-491, 1997.

SWOFFORD, D. et al. Phylogenetic inference. In: HILLS, D. M.; MORTIZ, C.; MABLE, B. K. (eds.) **Molecular systematic**. 2ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. p. 407-514.

TAYLOR, J. P. et al. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoil's using various

techniques. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 03, p. 387-401, 2002.

WARD, B. B. How many species of prokaryotes are there. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 16, p. 10234-10236, 2003.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Review**, v. 51, n. 02, p. 221-271, 1987.