

Raphael Medau

**Diversidade de bactérias *Burkholderia* em solo de Terra Preta Arqueológica da Amazônia
por análise em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) e
sequenciamento**

**Dissertação apresentada ao Centro de
Energia Nuclear na Agricultura –
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências.**

**Área de concentração: Biologia na
Agricultura e Ambiente.**

Orientadora: Prof^a. Dra. Siu Mui Tsai

Piracicaba – SP

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESDE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca – CENA/USP

Medau, Raphael

Diversidade de bactérias *Burkholderia* em solo de Terra Preta Arqueológica da Amazônia por análise em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) e sequenciamento /

Raphael Medau; orientadora Siu Mui Tsai. – Piracicaba, 2007.

71 f.:fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. 16S rRNA 2. ARDRA 3. Filogenia I. Título

CDU 631.4:577.2

*As pessoas importantes em minha vida,
familiares e escolhidos...
Michelle, Danielle, Marina, Ricardo (in memorian)
e Marília, pelo apoio, amor, estímulo e confiança...*

*À Família Romanelli, Dna Amélia, Sr. Reinaldo e
especialmente Rafael Jarrão...*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Siu Mui Tsai, pela oportunidade, orientação, amizade, confiança e estímulo ao crescimento profissional e pessoal;

À toda família Romanelli, em especial Dna Amélia, Sr. Reinaldo, Dna Fina, Daniela, Marcela e meu irmão Rafael “Jarrão” pelo apoio. São pessoas realmente especiais!!!

Agradeço minhas irmãs e minha mãe Marina pelo apoio, estímulo, amor e confiança. Ao meu pai Roberto pelo suporte e exemplo como pai durante meu curso de graduação;

À Marília F. Bernardi pela força, amor, estímulo e principalmente por ser parte fundamental de meus sonhos e planos;

Aos técnicos do Laboratórios de Biologia Celular e Molecular, Fábio Duarte, Francisco Montrazi, José Elias Gomes e Wagner Piccinini, aos amigos estagiários e estudantes de pós-graduação do CENA, Bianca Furlan, Camila Maistro Patreze, Daniela Tiago Silva Campos, Ézio Nalin, Fabiana Cannavan, Jeanedy Pazinato, Juliana Martinati, Luciana Chaves Ferreira, Ludmila Campos, Mariana Germano, Othon Silva Abrahão, Samanta Fedrizzi, por todo o apoio, amizade e ótima convivência no ambiente de trabalho;

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pela concessão da bolsa de mestrado;

À bibliotecária Marília R. G. Henyei pelo auxílio nas correções referente a elaboração da dissertação.

Ao Dr. Henri Berghs, pela grande contribuição nas análises computacionais;

A todas as pessoas que estiveram comigo nessa jornada, ajudando no desenvolvimento do trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos. À minha protetora, “Nossa Senhora”, por estar sempre presente na minha vida trazendo paz e força nos momentos difíceis.

Muito Obrigado!!

RESUMO

Dentre os vários microrganismos que fazem parte de microecossistemas de solos, as bactérias do gênero *Burkholderia* apresentam-se de interesse por possuírem amplo potencial agrícola e biotecnológico. São portadores de uma infinidade de características, como por exemplo: promotoras de crescimento em plantas com a fixação biológica do nitrogênio e produção de fitormônios, supressores de algumas doenças, biorremediadores, agentes de biocontrole e produtores de biopolímeros. Descrito por Yabuuchi et. al. (1992), o gênero ainda precisa ser melhor caracterizado, pois sua taxonomia vem sendo modificada de tal forma que novos componentes estão sendo frequentemente propostos, especialmente pela identificação de novos nichos ecológicos e sua ação no ambiente.

No Parque Nacional de Caxiuanã – Pará, Amazônia Oriental, os solos de origem antropogênica denominados Terra Preta Arqueológica (TPA) são caracterizados pelos elevados materiais orgânicos, que se auto-sustentam. Neste estudo, a diversidade do gênero *Burkholderia* foi avaliada por meio de técnicas microbiológicas (cultivo) e moleculares, como a Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) com sequências iniciadoras específicas para o gênero, usando o gene 16S rRNA. Os fragmentos amplificados foram analisados pelo sequenciador automático ABI 3100, com o intuito de gerar informações sobre as principais espécies de *Burkholderia* presentes em sítios de TPA e comparados com as espécies encontradas em solo de floresta nativa natural, adjacente à TPA. Apesar da maior estabilidade e presença de matéria orgânica em sítio TPA, os resultados revelam que as espécies do gênero *Burkholderia* são numericamente superiores em solo de floresta nativa natural, vindo a confirmar que aspectos físico-químicos (ex. pH) e a vegetação predominante nas áreas de estudo afetam diretamente na composição das comunidades microbianas. Algumas estirpes encontradas destacam-se pelo seu papel funcional no solo, muitas delas comumente associadas à fixação biológica de nitrogênio. Foram encontradas as espécies *Burkholderia silvatlantica*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia nodosa*, *Burkholderia terrae*, *Burkholderia hospita*.

Palavras-Chave: DGGE, *Burkholderia* spp., sequenciamento 16S Rrna

ABSTRACT

Amongst the various microorganisms from soil microecosystems, the genus *Burkholderia* has been studied since several properties have been discovered more recently, with high potential for agricultural and biotechnological exploitation. Species from this genus have infinite features, e.g. plant growth promoter with biological nitrogen fixation and production of phytohormones, capability for suppression of some diseases, bioremediation, biological control and production of biopolymers. Described by Yabuuchi et al. (1992), the genus still needs to be better characterized, since its taxonomy is frequently modified and several new species have been proposed, especially after recent identification of new ecological niches and their action in the environment.

In the National Park of Caxiuanã at the Eastern Amazon region are found anthrosols with past anthropogenic activity, constructed by the pre-historic Amerindians. These anthrosols are known as Archaeological Dark Earth (ADE) which has high and stable concentration of organic matter, thus keep their self-sustainability due to this high soil fertility. In this study, the diversity of genus *Burkholderia* was evaluated by means of microbiological (bacterial cultivation) and the molecular technique Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) using short and specific sequences designed for this genus, using the gene 16S rRNA. The amplified fragments from TPA were automated sequenced (ABI 3100) and the ADE diversity was compared with a pristine forest soil, located adjacent to TPA. Although the high stability and organic matter content in the ADE, the results showed a greater number of species from the genus *Burkholderia* in the pristine forest soil, located at the surrounding of the TPA soil. These data indicate that physical-chemical parameters (e.g. pH) and the prevalent vegetation in the studied areas can affect directly the structure of the microbial communities. Some strains could be distinguished by their functional role in soil, such as those associated with the ability for biological nitrogen fixation. The main species were *Burkholderia silvatlantica*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia nodosa*, *Burkholderia terrae*, *Burkholderia hospita*.

Key-Words: DGGE, *Burkholderia* spp., 16S rRNA sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Imagem aérea da Floresta Nacional de Caxiuanã-PA, obtida por meio do programa Google Earth 4.0.2091 (beta).....	17
Figura 2 -	Acesso ao sítio de TPA “topo de morrote” (a); Terra Preta Arqueológica TPA (tipo sambaqui) MINA I, Parque Nacional de Caxiuanã – Pará (b).....	26
Figura 3 -	Terra Preta Antropogênica – TPA (tipo sambaqui) - MINA I, Parque Nacional de Caxiuanã – Pará. (a); solo de floresta nativa natural, adjacente à TPA (b).....	27
Figura 4 -	Meio JMV semi-sólido amostra controle e com presença do “Anel” (seta +) (a); morfologia de colônias em meio JMV sólido (b); purificação em meio JMV sólido (c).....	29
Figura 5 -	Morfologia de colônias em meio PCAT (<i>Pseudomonas cepacia</i>), azelaic acid, tryptamin) (a); e o meio TB-T (<i>trypan blue Tetracycline</i>) (b).....	30
Figura 6 -	Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease <i>Msp</i> I após a amplificação do gene 16S rRNA dos isolados. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados de Terra Preta Arqueológica (1 a 32) e Solo de floresta nativa natural (33 a 64), adjacente à TPA.....	39
Figura 7 -	Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease <i>Msp</i> I após a amplificação do gene 16S rRNA dos isolados. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados de Terra Preta Arqueológica (65 a 82) e Solo de floresta nativa natural (83 a 100), adjacente à TPA.....	40
Figura 8 -	Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease <i>Msp</i> I após a amplificação do gene 16S rRNA dos isolados. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados de Solo de floresta nativa natural (101 a 155), adjacente à TPA.....	41
Figura 9 -	Análise por ARDRA, produtos de digestão enzimática com a endonuclease <i>Msp</i> I após a amplificação do gene 16S rRNA. Estirpes isoladas de amostras de TPA (* isolados seqüenciados).....	45
Figura 10 -	Análise por ARDRA, produtos de digestão enzimática com a endonuclease <i>Msp</i> I após a amplificação do gene 16S rRNA. Estirpes isoladas de amostras de FN (* isolados	

	seqüenciados).....	46
Figura 11 -	Elektroforese em gel de agarose 1% com DNA total do solo. Amostras de Terra Preta (TPA) e Solo de Floresta Natural (FN). LM- low mass DNA Ladder - (Invitrogen), os números acima das canaletas correspondem as profundidades e as letras correspondem as repetições.....	48
Figura 12 -	Elektroforese em gel de agarose 1% com produto de amplificação (oligonucleotídeos iniciadores específicos <i>BurkR</i> e <i>Burk3-clamp</i>). LM- low mass DNA Ladder - (Invitrogen). Amostras de Terra Preta (TPA) e Solo de Floresta Natural (FN). Os números acima das canaletas correspondem às profundidades e as letras correspondem às repetições.....	48
Figura 13 -	Diversidade de bactérias do gênero <i>Burkholderia</i> detectada em gel de DGGE, utilizando amostras de solos em quatro profundidades no sítio TPA MINAI e solo de floresta nativa natural. M ₁ e M ₂ são padrões conhecidos.....	49
Figura 14 -	Dendrograma obtido pela análise por DGGE das comunidades de bactérias do gênero <i>Burkholderia</i> em área de TPA e solo de Floresta Nativa Natural, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).....	50
Figura 15 -	Análise de PCA com bandas encontradas no DGGE utilizando os índices de similaridade de Jaccard (J).....	52
Figura 16 -	Dendrograma obtido a partir do sequenciamento das bandas obtidas no DGGE a partir das amostras do sítio de Terra Preta Arqueológica (TPA) e solo de Floresta Nativa Natural (FN), com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).....	59
Figura 17 -	Dendrograma obtido a partir do sequenciamento de UTOs excisadas do gel de DGGE, amostras de Terra Preta Arqueológica (TPA), com algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J). (*Estirpes padrão, fonte: EMBRAPA/CNPAB-RJ). Repetições representadas por a, b, c.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Caracterização química das amostras de Terra Preta Arqueológica e solo de floresta nativa (FN) nas profundidades de 10, 20, 30, 40 cm.....	28
Tabela 2 -	Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores internos para amplificação do gene 16S rRNA.....	33
Tabela 3 -	Estirpes isoladas de amostras de sítio de TPA tipo sambaqui e solo de Floresta nativa (FN) nas profundidades de 10, 20, 30, 40 cm.....	42
Tabela 4-	Seqüenciamento de bandas retiradas do gel de DGGE, amostras de TPA e solo de Floresta nativa Natural (FN) nas profundidades de 10.20, 30, 40cm.....	54

SUMÁRIO

RESUMO.....	04
ABSTRACT.....	05
LISTA DE FIGURAS.....	06
LISTA DE TABELAS.....	08
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Terra Preta Arqueológica (TPA).....	14
2.1.1 Solos de Terra Preta do tipo Sambaquis.....	16
2.2. O Gênero <i>Burkholderia</i>	17
2.2.1 Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> (CBC).....	18
2.2.2 Aplicações para o gênero <i>Burkholderia</i>	19
2.3. Estudos sobre diversidade microbiana.....	21
2.3.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante (DGGE).....	23
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Área Experimental.....	25
4.1.2 Amostragem.....	27
4.1.2 Caracterização Química.....	28
4.2 Isolamento Bacteriano.....	28
4.2.1 Extração de DNA dos isolados.....	31
4.2.2 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA).....	31
4.2.3 Sequenciamento do Gene 16S rRNA e Análise Filogenética das Sequências dos Isolados.....	32
4.3 Extração do DNA total do solo e Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	34
4.3.1 Análise dos <i>amplicons</i> do rRNA 16S por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante (DGGE).....	35
4.3.2 Purificação dos fragmentos amplificados.....	36
4.3.3 Sequenciamento dos fragmentos amplificados.....	37
4.3.4 Análise das Sequências.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 Isolamento, ARDRA e sequenciamento do gene 16S rRNA.....	38

5.2 Extração de DNA total do solo e análise por DGGE.....	47
5.2.1 Sequenciamento dos fragmentos das bandas do gel de Poliacrilamida com Gradiente Desnaturante.....	53
5.2.2 Análise das seqüências de UTOs obtidas pela técnica de DGGE.....	57
6. CONCLUSÕES.....	63
7. Referências Bibliográficas.....	64

1. INTRODUÇÃO

A Terra Preta Antropogênica (TPA) ocorre somente em sítios arqueológicos na região amazônica e estão presentes dos Andes até a Ilha de Marajó no Oceano Atlântico. Estes solos de origem antrópica foram enriquecidos em nutrientes, provavelmente pelo manejo de restos orgânicos (animais, plantas) e do fogo pelas populações pré-colombianas, que habitaram intensivamente em áreas adjacentes a rios, identificadas como sítios de alta fertilidade, denominados Terra Preta, devido à atividade antropogênica. Estima-se que 1 cm de Terra Preta (TP) leve pelo menos 10 anos para se formar. As TPA mostram tipicamente um horizonte AB espesso e de cor escura, elevados teores de fósforo, cálcio e alguns micronutrientes, como o manganês e o zinco. Apresentam também teores de matéria orgânica estável superiores aos solos adjacentes. As áreas de Terra Preta são consideradas pequenas, medem de 2 a 3 hectares, com horizonte AB bem definido em média 40 a 60 cm, mas podendo atingir até 2 m de profundidade.

Atualmente, há um grande interesse científico na elucidação da sua gênese, principalmente pela possibilidade de replicação destas áreas, que apresentam grande resiliência em manter suas boas qualidades químicas e físicas. Sabe-se que a diversidade microbológica da comunidade local é considerada o principal responsável pela sustentabilidade, porém apenas uma pequena porcentagem desta comunidade foi caracterizada. Populações ribeirinhas utilizam este solo há centenas de anos para a agricultura de subsistência em locais denominados “roçados”, onde a fertilidade é mantida a mesma por um longo período. Apesar da grande quantidade de sítios arqueológicos já conhecidos, não se tem um mapeamento de todas as ocorrências de TPA na Amazônia. A estimativa é que ocorram centenas de sítios espalhados pela região. Por exemplo, somente em Caxiuanã – PA foram descobertos 28 sítios arqueológicos com Terra Preta. Disponível em: < <http://www.museu-goeldi.br> >. Acesso em: 12 jul. 2007.

A biodiversidade e a atividade biológica estão relacionadas a funções e características essenciais para a manutenção da capacidade produtiva dos solos. Os microrganismos são

responsáveis por diversas atividades essenciais para o funcionamento e dos ecossistemas, como a fragmentação e a decomposição da matéria orgânica, a disponibilização de nutrientes do solo, a agregação das partículas do solo, entre outras (Moreira & Siqueira, 2002). As estruturas biológicas e suas funções são afetadas pelas alterações e perturbações ambientais, que induzem de um modo geral, a mudanças nas propriedades do solo. Por outro lado, a presença de material orgânico estável e a grande atividade biológica indicam que solos com alto conteúdo de material orgânico pode ser um sítio de alta diversidade microbiana, constituindo numa fonte de germoplasma microbiano. Inexiste informação detalhada e organizada sobre esta biodiversidade, assim como estudos sobre o efeito de manejo desses solos na sua biodiversidade e, que caracterize a função específica da biodiversidade no desenvolvimento da sua fertilidade sustentável.

O gênero *Pseudomonas* era, até recentemente, representado por organismos muito distintos que não apresentam claras relações filogenéticas. A partir de estudos genéticos foi sugerida a divisão do gênero em 5 grupos. O primeiro foi o único aceito como autêntico para *Pseudomonas*, o grupo II incluiu as espécies *P. solanacearum*, *P. cepacea*, *P. fladioli*, *P. caryophylli*, *P. mallei*, *P. pseudomallei* e *P. pickettii*, proposto como *Burkholderia* (PALLERONI et al., 1973, GILLIS et al., 1995). Os grupos restantes não incluíram bactérias do grupo *Burkholderia*.

Descrito por Yabuuchi et al. (1992), o gênero ainda precisa ser melhor caracterizado, sua taxonomia vem sendo modificada de tal forma que novos componentes estão sendo frequentemente propostos, sendo que este gênero foi descrito como pertencente à classe das proteobactérias subclasse beta, gram-negativos, aeróbicos e móveis, podendo acumular poli- β -hidroxialcanoatos como materiais de reserva, com temperatura ótima de crescimento entre os 30° e 35°C.

Burkholderia são microrganismos com amplo potencial agrícola e biotecnológico, apresentam uma ampla distribuição, ocorrendo no solo, água, em associação com plantas, fungos,

animais e humanos. São portadores de uma infinidade de características benéficas, do ponto de vista ecológico e econômico, como por exemplo: são promotoras de crescimento em plantas com a fixação biológica do nitrogênio, produtoras de fitormônios, supressoras de algumas doenças, biorremediadoras, agentes de biocontrole e produtoras de biopolímeros.

Burkholderia cepacia, anteriormente classificada como *Pseudomonas cepacia* é considerada espécie padrão do gênero e foi inicialmente identificada como fitopatogênica causadora da podridão da casca de cebola (BURKHOLDER et al., 1950). Nas últimas décadas, estudos demonstraram que os diversos isolados, aparentemente semelhantes, apresentavam diferenças genotípicas. O que havia sido inicialmente classificado como uma única espécie dentro do gênero *Burkholderia*, na realidade eram várias espécies filogeneticamente associadas, mas com grande semelhança fenotípica. Surgiu então, o “complexo *Burkholderia cepacia*” (CBC) para classificar esses grupos, e a cada grupo distinto utilizou-se o termo “genomovar” (COENYE & VANDAMME, 2003). Atualmente, o “complexo *Burkholderia cepacia*” está descrito em nove diferentes genomovars que somados a trinta e duas outras espécies constituem o gênero *Burkholderia* (COENYE et al., 1999).

Segundo Coenye e Vandamme (2003), o grupo denominado “complexo *Burkholderia cepacia*” (CBC) constitui um conjunto de espécies que podem interagir com fungos, protozoários, espécies vegetais (fitopatogênicos e fixadores de nitrogênio), humanos (patógenos em infecções hospitalares e a Síndrome Cepacia). Embora os estudos com o “CBC” tenham sido realizados desde décadas passadas, a taxonomia dos membros do complexo e de todo o gênero *Burkholderia* ainda está sendo modificada, de tal forma que novos componentes estão sendo frequentemente propostos, como foi recentemente incluída a *Burkholderia ubonensis* (COENEY et al., 2003), considerada o décimo membro do complexo. Alguns trabalhos avaliaram a diversidade do gênero obtida de fontes ambientais, concluindo que estas espécies representam um grupo diverso dos microrganismos envolvidos em uma ampla escala de funções, o que tornam estudos ainda mais detalhados dessa bactéria essenciais.

Os avanços das técnicas de biologia molecular como, por exemplo, a eletrofose em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) e o sequenciamento têm contribuído significativamente para o entendimento dessas comunidades, inclusive de microrganismos não cultiváveis. A técnica DGGE é fundamentada na separação de fragmentos de DNA com o mesmo tamanho, porém com seqüências de nucleotídeos diferentes, baseada na mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA parcialmente desnaturada em géis de poliacrilamida contendo gradiente crescente de agentes desnaturantes (uréia e formamida) (MUYZER et al., 1993).

O presente trabalho teve como objetivo identificar espécies do gênero *Burkholderia* presentes em sítio de Terra Preta Arqueológica (tipo sambaqui) e solo adjacente, constituído por uma floresta nativa natural na região Amazônica utilizando técnicas microbiológicas e moleculares como PCR-DGGE e o posterior sequenciamento com intuito de gerar informações mais detalhadas na busca da melhor compreensão da diversidade do gênero e posterior entendimento do seu papel no solo. Estudos detalhados deste gênero tornam-se necessários visando a descoberta de novas estratégias para uso biotecnológico, agrícola ou farmacêutico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Terra Preta Arqueológica (TPA)

Solos de Terra Preta Arqueológica são encontrados desde as bases inclinadas da Cordilheira dos Andes até a Ilha de Marajó no Oceano Atlântico. Recebe tal denominação porque normalmente o material arqueológico é bem diversificado, o que leva a crer que grupos culturais distintos habitaram um mesmo local, evidenciando que as populações eram grandes e encontravam-se assentadas ao longo dos rios. Tem como característica marcante uma camada superficial de coloração preta ou marrom escura com alta fertilidade e sustentabilidade.

Nestes solos, a coloração escura é resultado do acúmulo de resíduos vegetais, animais, cinzas e cerâmicas que formam um material orgânico estável com microecossistemas próprios, que se auto-sustentam e caracterizam a TPA, apresentam altos teores de cálcio, carbono, magnésio, manganês, fósforo e zinco, elementos que tornam a terra fértil. As áreas de Terra Preta são consideradas pequenas, medem de 2 a 3 hectares com perfil de TPA em média de 40 a 60 cm, mas podendo atingir até 2 m de profundidade.

Segundo Smith (1980) a existência de TPA em grandes números na bacia Amazônica evidencia que as populações indígenas (Ameríndios), antes do contato com os europeus, eram grandes e encontravam-se assentadas nesta região. Alguns trabalhos estimaram que o número de índios no final do século XV era de aproximadamente de 6,8 milhões (DENEVAN, 1976).

Apesar da grande quantidade de sítios arqueológicos já conhecidos, não se tem um mapeamento de todas as ocorrências de TPA na Amazônia. Atualmente sítios de TPA são de extrema importância para a agricultura de subsistência das populações ribeirinhas, conhecidos como roçado essas áreas vêm sendo utilizadas para plantação de várias culturas como mamão, feijão, mandioca, entre outras.

Estudos comprovam que a alta fertilidade desses solos foi proporcionada pelo manejo de restos orgânicos, resultado da combustão incompleta desse material, já que a quantidade de carvão é considerada atualmente como responsável pela maior diferença que existe entre a TPA e os solos de floresta nativa natural. Nestes solos, adjacentes à TPA, ocorre a rápida decomposição da matéria orgânica, devido as altas temperaturas, precipitações elevadas e uma deficiência de minerais estáveis (GLASER et al., 2001).

Estudos recentes comprovam que sítios de Terra Preta Arqueológica apresentam grande atividade biológica, indicando que este tipo de solo pode ser um sítio de alta diversidade microbiana (TSAI, 2003). Porém não se tem conhecimento de toda biologia, estrutura e diversidade das comunidades específicas deste solo, tornando necessário o aprofundamento no conhecimento sobre a diversidade microbiana para melhor compreensão das funções exercidas pelos microrganismos, bem como o conhecimento de interações entre elas, além de benefícios econômicos e estratégicos, como a descoberta de espécies potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos.

2.1.1 Solos de Terra Preta do tipo Sambaquis

Os solos de Terra Preta do tipo sambaquis apresentam coloração escura, com 30 a 60 cm de espessura, horizonte A bem desenvolvido, geralmente sob Latossolos Amarelos, contendo fragmentos de artefatos cerâmicos e ainda artefatos líticos, por vezes fragmentos ou acúmulos de conchas. A TPA do tipo sambaqui contém muita matéria orgânica, quartzo, caulinita e oxi-hidróxidos de Fe. São ricos em SiO_2 e Al_2O_3 , e ainda Fe_2O_3 e TiO_2 . Em termos de Ca, Mg, K e P, e dos elementos traços Cu, Mn, Zn, estes estão mais concentrados nas TPA's do que nos horizontes A dos Latossolos Amarelos.

Na região de Caxiuanã, assim como em várias outras da Amazônia, encontram-se várias áreas pequenas com ocorrência de TPA tipo sambaquis. Apesar da grande quantidade de sítios arqueológicos já conhecidos, não se tem um mapeamento de todas as ocorrências de TPA na Amazônia. Disponível em: <<http://www.museu-goeldi.br>>. Acesso em 12 jun. 2007.



Figura 1- Imagem aérea da localização da Floresta Nacional de Caxiuanã – PA obtida por meio do programa GoogleEarth 4.0.2091 (beta).

2.2. O Gênero *Burkholderia*

Atualmente, o gênero *Burkholderia* representa um importante componente da comunidade microbiana do solo, são de grande interesse por apresentar um amplo e distinto conjunto de características e estarem presentes nos mais diversos ambientes como no solo, água, em associação com plantas, fungos, animais e seres humanos. São classificados como gram-negativos, mesófilos, com temperatura ideal de crescimento variando entre 30° e 35°C e com capacidade de acumular poli- β -hidroxialcanoatos como materiais de reserva. Capazes de crescer utilizando diversas fontes de carbono (PALLERONI, 1984).

Muitas espécies pertencentes ao gênero têm a capacidade de produzir compostos com atividade antimicrobiana, agentes de biocontrole, fixadores biológicos de nitrogênio, produtores de plásticos biodegradáveis e biorremediadores (CARTWRIGHT et al., 1995; HEUER et al., 1997; KANG; EL BANNA e WINAELMANN, 1998). O gênero *Burkholderia* foi descrito em 1992 por Yabuuchi como proteobactéria, subclasse beta, desde então, a lista de espécies foi alterada inúmeras vezes. Muitas foram removidas do gênero (YABUUCHI et al., 1995), outras mais tarde adicionadas e inúmeras vêm sendo descritas (GLILLS et al., 1995; VIALARD et al., 1998).

2.2.1 Complexo *Burkholderia cepacia* (CBC)

Burkholderia cepacia, foi descrita por Burkholder (1950) como espécie fitopatogênica, responsável pelo apodrecimento dos bulbos de cebolas. Nas últimas décadas estudos envolvendo técnicas moleculares reclassificou as espécies pertencentes ao gênero *Burkholderia*, o que anteriormente foi classificado como uma única espécie na realidade eram várias espécies filogeneticamente associadas com grande semelhança fenotípica (VANDAMME et al., 1997). A este grupo foi criada a expressão “complexo *Burkholderia cepacia*” (CBC) e a cada grupo distinto desse complexo foi empregado o termo “genomovar”.

Em 1997, foi comprovado que estes organismos partilhavam características fenotípicas semelhantes, mas genotípicas diferentes, podendo pertencer a pelo menos cinco espécies diferentes. Atualmente o “complexo *Burkholderia cepacia*” está descrito em nove diferentes grupos: *B. cepacia* (Genomovar I); *B. multivorans* (Genomovar II); *B. cenocepacia* (Genomovar III); *B. stabilis* (Genomovar IV); *B. vietnamiensis* (Genomovar V); *B. dolosa* (Genomovar VI); *B. ambifalaria* (Genomovar VII); *B. anthina* (Genomovar VIII); *B. pyrrocinia* (Genomovar IX).

Em adição aos nove genomovars do complexo *B. cepacea*, trinta e quatro outras espécies constituem o gênero e são: *B. andropogonis*, *B. celendonica*, *B. caribensis*, *B. caruophulli*, *B. fungorum*, *B. gladioli patovares cocovenenans* e *agaricicola*, *B. galthei*, *B. glumae*, *B. graminis*, *B. hospita*, *B. kuruiensis*, *B. mallei*, *B. phenazinium*, *B. phenaliruptrix*, *B. phymatum*, *B. phytofirmans*, *B. plantarii*, *B. pseudomallei*, *B. sacchari*, *B. sordidicola*, *B. terricola*, *B. thailandensis*, *B. tropica*, *B. tuberum*, *B. ubonensis*, *B. unamae*, *B. xenovorans*, *B. terrae*, *B. brasiliensis*, *B. singaporensis*, *B. koreensis*, *B. silvatlantica*, *B. mimosae* (COENYE, 2005).

As linhagens do complexo *Burkholderia cepacia* (CBC) podem ser isoladas de diversos ambientes e são capazes de interagir com fungos, protozoários, espécies vegetais, animais e humanos. Estudos identificaram o gênero *Burkholderia* como agentes de biocontrole, supressoras de doenças em diferentes culturas, fixadores biológicos do nitrogênio (FBN), biorremediadores e com considerável potencial na produção de plásticos biodegradáveis (ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2001; COENYE; VANDAMME, 2003).

2.2.2 Aplicações para o gênero *Burkholderia*

a) Fixação biológica do nitrogênio: A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um processo comum entre bactérias do gênero *Burkholderia*. Essa capacidade foi observada inicialmente para *B. vietnamiensis* (TRÂN VAN et al., 1996), mais tarde estendida à outras espécies

como *B. kururiensis* (ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2001), *B. unamae* (CABALLERO-MELLADO et al., 2004), *B. tropica* (REIS et al., 2004; WEBER et al., 2000) e *B. brasiliensis* (REIS et al., 2004; WEBER et al., 2000).

- b) Controle biológico de doenças em plantas: algumas espécies identificadas como agentes de biocontrole de muitos fungos patogênicos em plantas, tais como o *Pythium* sp., *Aphanidermatum* sp., *Pythium ultimum*, *Fusarium capsici*, *Phytophthora* sp. e *Rhizoctonia solani* (HEBBAR et al., 1998; HEYDARI et al., 2000; HILL et al., 2000). A capacidade dessas linhagens em suprimir doenças em planta foi observada em culturas como milho, milho doce, algodão, ervilha, tomate e pimenta (HEBBAR et al., 1998; HEYDARI e MISASHI, 2000; LI et al., 2002).
- c) Biorremediação: Um processo onde os microrganismos são empregados para reduzir a concentração e toxicidade de poluentes químicos do ambiente (DUA et al., 2002). Muitas linhagens, identificadas como *B. cepacia*, mostraram ser capazes de degradar compostos xenobióticos, como o cianido e os biphenyls polychlorinated (PCBs) (ADJEI; MALTSEVA et al., 1999). Estudos sobre a diversidade de comunidades bacterianas do solo contaminados com o herbicida 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D), identificaram que o gênero *Burkholderia* era prevaiente e estavam envolvidas na degradação do herbicida (TIEDJE et al., 1999).
- d) Produção de plásticos biodegradáveis: Plásticos biodegradáveis são degradados por microrganismos quando descartados no solo, em aterros diferenciando dos plásticos de origem de petróleo pelo tempo de degradação. *Burkholderia sacchari*, isolada de solo em plantação de cana, produz esse tipo de plástico. Pesquisas vêm sendo desenvolvidas em algumas usinas no estado de São Paulo-Brasil (BRAMER et al., 2001).

- e) Promotores de crescimento: A produção de reguladores de crescimento ativos como fitormônios faz parte do metabolismo de diversas espécies de bactérias associadas aos vegetais e podem ser considerados agentes causais da alteração do crescimento e desenvolvimento vegetal (BASHAN & HOLGUIM, 1997). Através da produção de fitormônios, os microrganismos do gênero *Burkholderia* podem promover um estímulo ao crescimento vegetal, e aumentar a produção de metabolitos pelas plantas que podem ser utilizadas para o seu próprio crescimento. Efeitos promovidos por substâncias ativas como fitormônios produzidos por bactérias, também podem ocorrer pela liberação de auxinas no interior da planta por endofíticos.
- f) Agentes patogênicos em humanos: Contrastando com as potencialidades apresentadas para a agricultura, o complexo *Burkholderia cepacia* também apresenta espécies com considerados patógenos oportunistas em infecções humanas, criando crescentes preocupações sobre a eventual relação entre isolados ambientais (ou lançados no ambiente) e clínicos e os potenciais riscos de utilização desta bactéria como agente de controle biológico. Essas bactérias emergiram nas últimas duas décadas como patogênicas oportunistas em doentes com fibrose cística (CUNHA et al., 2003).

2.3. Estudos sobre diversidade microbiana

Os microrganismos são representantes de uma rica diversidade, desempenhando funções únicas e cruciais na manutenção dos ecossistemas. Vêm sendo explorados há muitos anos visando a obtenção de produtos biotecnológicos, como a produção de antibióticos, alimentos, ácidos orgânicos e biorremediação. Na agricultura, também são importantes para o aumento da fertilização de solos, seja por meio da fixação biológica do nitrogênio, ou pela solubilização de fosfato e pelo controle biológico de pragas e doenças. Apesar do grande esforço e importância, estima-se que menos de 5% dos microrganismos existentes no planeta foram caracterizados e descritos.

Os benefícios científicos esperados com um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana incluem, entre outros, a melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades nos ambientes terrestres e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade, como por exemplo, as plantas e os animais. A caracterização dos microrganismos presentes no solo é de grande importância para o entendimento do mesmo, muitos estudos foram realizados para determinar fatores que regulam a estrutura das comunidades microbianas através das escalas temporal e espacial e o impacto de diferentes espécies de plantas na diversidade microbiana.

A dificuldade nos estudos em amostras ambientais deve-se em grande parte aos métodos tradicionalmente utilizados para o isolamento e cultivo de microrganismos em laboratório (RANJARD et al., 2000), uma vez que apenas uma pequena fração dos organismos na natureza, pode ser cultivada pelo uso de técnicas microbiológicas de rotina. O avanço na área de biologia molecular acarretou uma revolução nos estudos sobre diversidade microbiana; bem como em outras áreas (TORSVIK et al., 1990; AMANN et al., 1995).

Lambais et al. (2006) estudaram a biodiversidade microbiana da folha de três espécies de árvores da Floresta Amazônica, amplificando o gene 16S rRNA. Uma varredura das amostras de folhas indicou uma diversidade de 95 a 671 espécies por amostra. Comprovando que métodos rápidos e moleculares de análises para a diversidade das comunidades microbiológicas são necessários.

Dentre as técnicas mais utilizadas para os estudos de diversidade bacteriana destacam-se a caracterização fenotípica e a genotípica, baseada em técnicas moleculares. A caracterização fenotípica é realizada por meio de avaliações de mudanças fenotípicas no meio de cultivo, velocidade de crescimento e características das colônias. Quanto à caracterização genética, existem técnicas que na sua grande maioria envolvem o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR), como a amplificação de regiões conservadas com primers universais 16S rRNA (Woese, 1994).

Os mapas de diversidade genética fornecem uma ferramenta importante para a compreensão da taxonomia, estrutura populacional e dinâmica das bactérias, sendo importantes na resolução de métodos rápidos, específicos e sensíveis. Na natureza apenas uma pequena fração dos microrganismos é cultivável por meio do emprego de métodos microbiológicos convencionais (AMANN et al., 1995). Com a evolução das técnicas em biologia molecular, métodos baseados na análise das proteínas e principalmente dos ácidos nucleicos têm sido utilizados para a caracterização bacteriana. Estas técnicas possuem diferentes níveis de resolução para detectar a variabilidade entre as linhagens (PALLERONI, 1993).

2.3.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante (DGGE)

A variabilidade nas seqüências do 16S rDNA pode ser avaliada, por exemplo, através de eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE). Essa técnica foi utilizada primeiramente por Muyzer et al. (1993) e está fundamentada na separação de fragmentos de DNA com o mesmo tamanho, porém com seqüências de nucleotídeos diferentes, baseada na mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA parcialmente desnaturada em géis de poliacrilamida contendo gradiente crescente de agentes desnaturantes (uréia e formamida). Devido a essa característica podemos detectar as substituições em uma única base (nucleotídeo) entre as seqüências de até aproximadamente 500 pares de bases (VALLEYS et al., 1997).

A dissociação ocorre com a desnaturação dos pares de bases devido ao aumento da concentração do desnaturante. Uma vez alcançada a dissociação com a concentração, ocorre a transição da forma helicoidal do DNA para a forma de um fragmento parcialmente dissociado e a migração então cessa. Esse gradiente de concentração no domínio da dissociação está relacionado com uma posição particular no gel, portanto a variação de seqüências resulta em diferentes domínios de dissociação com diferentes gradientes de concentração. Resultando em seqüências variadas de fragmentos particulares que irão parar de migrar em diferentes posições do gel, sendo assim, separados (OLIVEIRA, 2000). De acordo com Muyzer et al., (1993), o DGGE é uma

técnica muito apropriada não somente para caracterizar comunidades complexas, como também para inferir filogenia dos membros da comunidade, testar pureza de linhagens bacterianas, monitorar o isolamento de microrganismos a partir de amostras ambientais e acompanhar a dinâmica de populações específicas em funções de variações ambientais ou das condições operacionais de um sistema.

O *fingerprinting* por DGGE, associado ao sequenciamento das bandas e análise filogenética, tem sido muito empregada nos estudos da diversidade estrutural de comunidades microbianas (MUYZER et al., 1996; TESKE et al., 1996; MANFIO et al., 1999). O sequenciamento das bandas apresentadas no gel podem ser submetido a bancos de dados mundiais, permitindo comparação de resultados de pesquisadores de todo o mundo. Ao mesmo tempo estas seqüências podem ser re-analisadas conforme o banco de dados aumenta, possibilitando atualização filogenética dos trabalhos.

Segundo Oliveira (2000) dentre as vantagens da técnica do DGGE podemos citar: a) a técnica permite estudar de maneira relativamente rápida e simples a variabilidade espaço-temporal das populações, pois adota padrões de bandas; b) permite ter uma idéia global das espécies predominantes no ecossistema que se esta sendo estudado; c) é adequada para analisar um grande número de amostras quando comparada com outras técnicas tais como a clonagem; d) Permite enfocar esforços na busca diferencial de representantes do domínio *Bacteria* e *Archaea*; e) permite a excisão das bandas nos géis para sequenciamento dos fragmentos contidos nas bandas. Como todos os métodos que envolvem técnicas baseadas em PCR-DGGE, alguns aspectos devem ser previamente considerados quando se deseja estudar comunidades microbianas, como por ex., a presença de espécies diferentes, porém com teores G+C% muito próximos, dificultando a análise das comunidades, traduzidas como UTOs – Unidades Taxonômicas Operacionais. Jones e Thies (2007) propuseram um método complementar ao DGGE, acoplando uma análise bidimensional em gel de poliacrilamida para separar os fragmentos de PCR gerados por comunidades microbianas, evitando desse modo a sobreposição de fragmentos.

3. OBJETIVOS

Identificar as principais espécies de bactérias do gênero *Burkholderia* presentes em sítios de Terra Preta Arqueológica (TPA) e Floresta Nativa (FN) na região de Caxiuanã-PA usando a técnica de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ou eletroforese de gel com gradiente desnaturante e análise de fragmentos denominados por UTOs (unidades taxonômicas operacionais) por sequenciamento para fins de identificação das espécies prevalentes, usando seqüências específicas para amplificação deste gênero pelo gene 16S rRNA. O cultivo seletivo e isolamento foram realizados em paralelo para identificação dos isolados pelo sequenciamento completo do gene 16S rRNA para fins de depósito em banco internacional de dados (NCBI) e análise comparativa com estirpes padrões deste gênero, depositadas em banco de bactérias da EMBRAPA-CNPAB, Seropédica – RJ.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área Experimental

A região de Caxiuanã está localizada em terras dos municípios de Melgaço e Portel – PA, na Amazônia Oriental, entre a ilha de Marajó e o rio Xingu. Neste trabalho as coletas foram feitas na região da Flona Caxiuanã, sítio Arqueológico MINA I (1°40'45,5''S e 51°20'71''W). O clima é quente e úmido com temperatura média entre 25° C e 35° C. A Vegetação no local é formada por espécies nativas e encontramos a presença de algumas culturas como laranjeiras, mamão, entre outras deixadas pelos homens que viveram na área. Hoje considerada sítio de TPA, há grande predominância de terras acidentadas, e o solo apresenta características arenosa nas áreas mais altas e argila nas áreas mais baixas. O sítio de Terra Preta Arqueológica do tipo sambaqui, assim como em várias outras da Amazônia ocupam o topo de morrotes (figura 2), de pontas de terra da baía e dos seus tributários como o rio Caxiuanã e o igarapé Caquajó. Estão formados sobre Latossolos Amarelos, com os quais interagiram químico-mineralogicamente, são solos de cor preta, com 30 a 60cm de espessura, com horizonte A bem desenvolvido, contendo fragmentos

de artefatos cerâmicos e ainda artefatos líticos, por vezes fragmentos ou acúmulo de conchas. Esses podendo alcançar até 80cm de espessura e dezenas de metros de extensão. O contato com os Latossolos Amarelos é gradual, mas irregular.

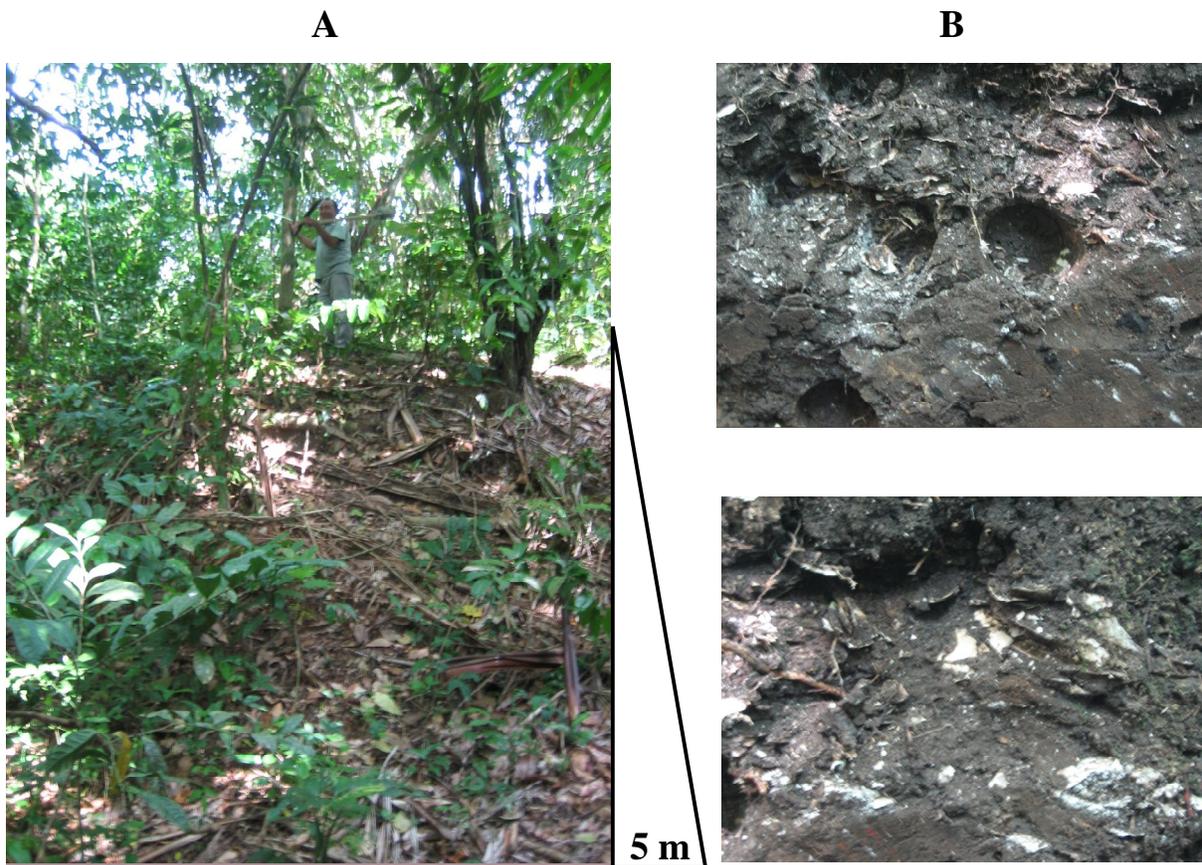


Figura 2 - Acesso ao sítio de TPA “topo de morrote” (a); Terra Preta Arqueológica – TPA tipo sambaqui (b) MINA I, Parque Nacional de Caxiuanã – Pará.

4.1.2 Amostragem

A coleta das amostras foi realizada nas profundidades de 10, 20, 30 e 40cm, com cinco repetições, em sítio de Terra Preta Arqueológica (tipo sambaqui) Flona de Caxiuanã próxima à Estação Científica Ferreira Penna e solo de floresta nativa natural, adjacente à TPA. Para a coleta utilizou-se amostrador cilíndrico de aço inoxidável com 5cm de diâmetro e 5cm de comprimento (Figura 2).

Após a coleta as amostras foram armazenadas em caixas de isopor contendo gelo seco e enviadas ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP. Uma parte dos solos foi acondicionada a - 4° C para análise microbiológica e química, outra parte foi armazenada a - 20° C para posterior análise molecular.

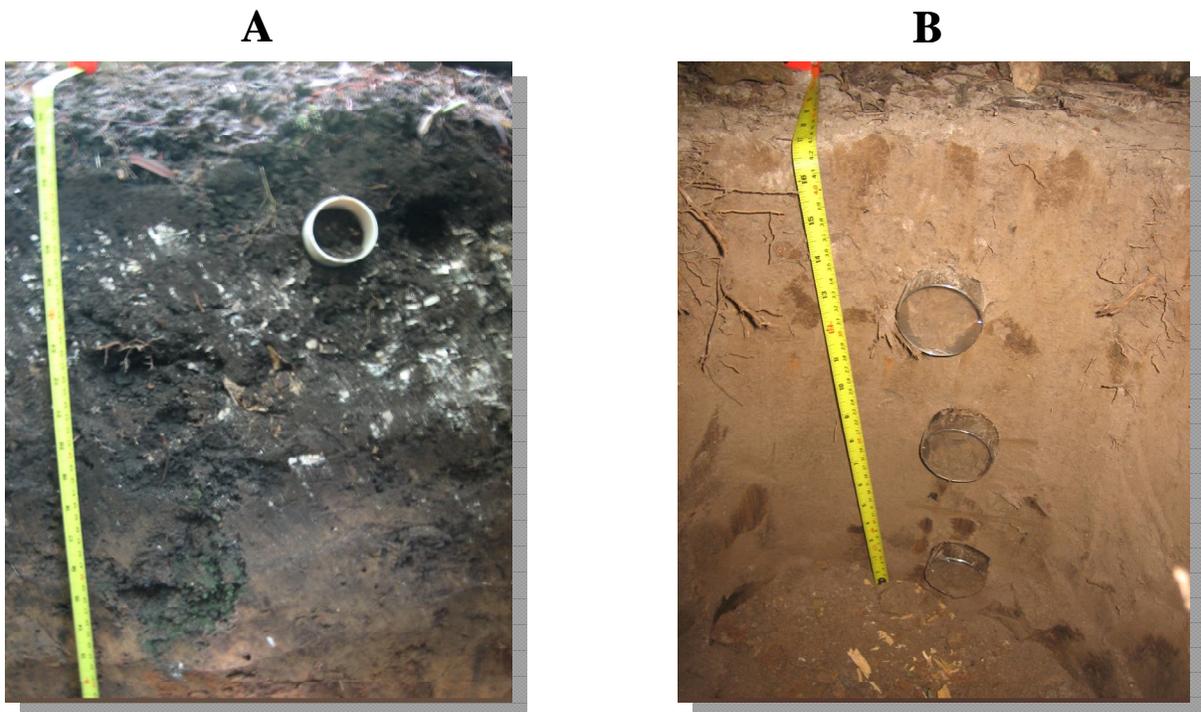


Figura 3 - Terra Preta Antropogênica – TPA (tipo sambaqui) - MINA I, Parque Nacional de Caxiuanã – Pará. (a); solo de floresta nativa natural, adjacente à TPA (b).

4.1.2 Caracterização Química

A análise química do solo foi realizada para o sítio de Terra Preta Arqueológica do tipo sambaqui (TPA) e solo de floresta nativa natural (FN), nas profundidades de 10, 20, 30, 40cm. As análises foram realizadas no Instituto Agronômico – Campinas/SP.

Tabela 1 - Características químicas de amostras de solos de Terra Preta Arqueológica (TPA) Mina I e solo Floresta Nativa (FN), nas profundidades de 10, 20, 30 e 40cm.

	pH	Matéria em CaCl ₂ ¹ Orgânica ²	P ³	K ⁴	B ⁴	Cu ⁴	Fe ⁴	Mn ⁴	Zn ⁴	Al ⁵	H+Al ⁶	Soma Bases	CTC total	Sat. de bases
	1:2,5	dag/dm ³	mg/dm ³						mmol/dm ³		-----%-----			
Terra Preta MINA I														
TPI 10 cm	7,2	59	195	0,3	0,10	1,2	16	13,5	2,6	<1	9	427,3	436,0	98
TPI 20 cm	7,2	57	157	0,2	0,08	0,8	10	9,0	2,0	<1	8	265	355,0	97,5
TPA 30 cm	7,3	30	135	0,2	0,08	0,7	11	9,5	1,0	<1	8	265,2	273,0	96
TPA 40 cm	7,3	19	206	0,2	0,09	0,3	9	4,5	0,5	<1	8	173,2	181,0	96
Solo adjacente Floresta Nativa														
FN 10 cm	4,0	27	21	0,6	0,20	0,2	214	3,4	0,5	15	80	16,6	98,1	19
FN 20 cm	4,0	20	19	0,3	0,18	0,2	204	<0,1	0,3	22	88	8,3	96,7	9
FN 30 cm	4,0	18	21	0,3	0,15	0,2	198	0,3	0,3	23	88	7,3	95,7	8
FN 40 cm	3,9	14	16	0,2	0,17	0,2	143	0,7	0,3	24	80	9,2	88,7	10

Métodos utilizados pela empresa para a extração dos nutrientes do solo: (1) pH em Água pelo Método Potenciométrico; (2) Matéria Orgânica: Método Walkley-Black modificado por diferença de densidade óptica; (3) P: extrator Mehlich; (4) K e Na: Fotometria de Emissão; (5) Ca e Mg Trocável por Espectrometria de Absorção Atômica; (6) Acidez Potencial (H+Al) pelo Método Potenciométrico do SMP (Schmacker, Mclean, Pratt).

4.2 Isolamento Bacteriano

Foram utilizados para o isolamento das bactérias do gênero *Burkholderia* três meios de cultivo seletivo e semi-seletivo, o plaqueamento foi realizado a partir de uma diluição decimal em série, adicionando-se 10,0g da amostra de solo em erlenmeyer contendo 90,0ml de solução salina 0,85% estéril. Após agitação da mistura, preparou-se a partir desta, diluições de 10⁻² a 10⁻⁶ pelas sucessivas transferências de 1,0ml de suspensão mais concentrada de solo, para tubos de ensaio contendo 9,0ml de solução salina a 0,85% estéril. Utilizamos para o plaqueamento 1,0ml das diluições 10⁻³ e 10⁻⁶ em placas de Petri com meios de cultivo: JMV semi-seletivo (BALDANI, 1996), TB-T (HAGEDORN et al., 1987) e PCAT (BURBAGE & SASSER 1982).

O meio de cultura semi-sólido JMV permite o isolamento do grupo de bactérias *Burkholderia* caracterizadas como diazotróficas. Trabalhos anteriormente relatam o isolamento destas bactérias em cana-de-açúcar, batata-doce, mandioca e principalmente arroz cultivado no Brasil, sendo o nome *B. brasiliensis* proposto como uma nova espécie endofítica e fixadora de nitrogênio (BALDANI, 1996). Composição do meio JMV em g/l: 5,0 Manitol; 0,6 KH_2PO_4 ; 0,2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 NaCl; 0,2 CaCl; 2,0ml azul de bromotimol (Solução. 0,5% em 0,2N KOH); 2,0ml solução de micronutrientes (0,04 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1,2 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 1,4 H_3BO_3 , 1,0 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,175 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); 1,0ml solução de vitaminas (100mg biotina; 200mg piridoxol-HCl); 4,0 ml FeEDTA(solução 1,64%). O pH foi ajustado para 4.0 a 4.5 e adicionado 2,5 de ágar para o meio semi-sólido; 20 de ágar e 50mg de extrato de levedura para o preparo do meio sólido.

Foi inoculado 1ml das diluições do solo em meio de cultivo semi sólido, então incubadas a 32° C. Após cinco (5) dias de incubação foi observada uma película grossa, amarelo-laranja devido a presença do azul de bromotimol (figura 4a). Ao microscópio, as células são pequenas e pouco móveis. Após isolamento em meio JMV semi-sólido as células foram transferidas para placas de petri com meio sólido (formando colônias côncavas, opacas, redondas e úmidas) e então é realizada a contagem das UFC.



Figura 4 - Meio JMV semi-sólido amostra controle e com presença do “Anel” (seta +) (a); morfologia de colônias em meio JMV sólido (b); purificação em meio JMV sólido (c).

O meio PCAT foi descrito para o isolamento de bactérias pseudomonas, atualmente vêm sendo utilizado para o gênero *Burkholderia*. Composição em g/l : 2,0 ácido azeláico; 0,2

triptamina; 0,1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 4,0 KH_2PO_4 ; 4,0 K_2HPO_4 ; 0,02 extrato de levedura; 15,0 ágar; ajustar pH para 5,7. O meio TB-T possui a seguinte composição em g/l: 2,0 glucose; 1,0 L-asparagine; 1,0 NaHCO_3 ; 0,5 KH_2PO_4 ; 0,01 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 trypan blue; 0,02 tetracycline; 0,005 crystal violet; 0,005 nystatin; 20 ágar; ajustar para pH 5,5.

Para a diluição e plaqueamento nos meios PCAT e TB-T utilizamos a mesma metodologia descrita acima. As placas de Petri foram incubadas a 29° C por 7 dias. Após esse período foi realizado a purificação das colônias em novas placas com meio de cultivo. A determinação da população de bactérias foi realizada utilizando-se a técnica “Pour Plate” de contagem em placas de Petri.

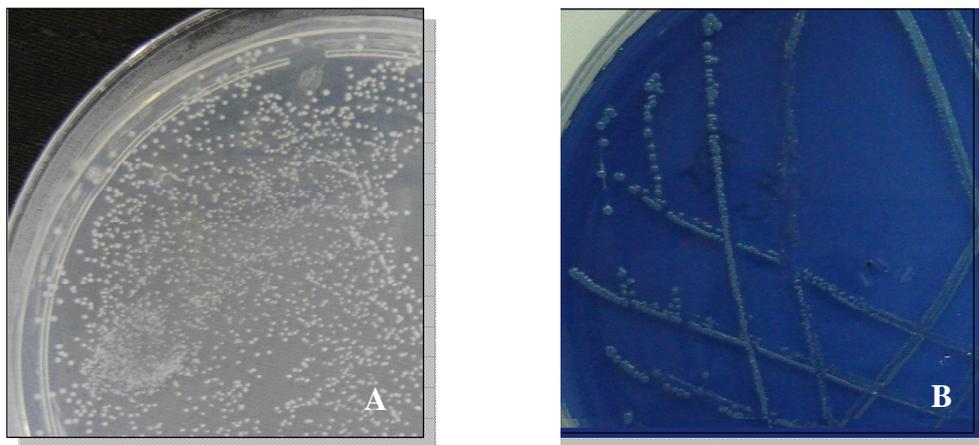


Figura 5 - Morfologia de colônias em meio PCAT (*Pseudomonas cepacia*, azelaic acid, tryptamin) (a); e o meio TB-T (*trypan blue*, *tetracycline*) (b).

4.2.1 Extração de DNA dos isolados

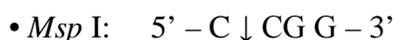
Para obtenção do DNA das culturas, foi utilizado o protocolo de extração Doyle & Doyle adaptado (1990). Os isolados foram cultivados em 10mL de meio de cultura líquido e incubados a 29°C, em shaker, a 120rpm. Após esse período, uma alíquota de 250µl da suspensões de células foi conservada a -80° C em glicerol 50% para armazenamento das linhagens. Da suspensão bacteriana, 1,5µl foi recolhida em tubos e centrifugada por 15min. a 14.000 rpm e o sobrenadante descartado. O precipitado foi então ressuscitado em 500µL de TE (Tris-HCl 1 M; pH 7,5; 10 ml; EDTA 0,5 M; pH 8,0; 2ml de água destilada) e centrifugado a 14.000rpm. O sobrenadante novamente descartado e o precipitado ressuscitado em 500µL de TE, onde foram adicionados 30µL de SDS 10% e 0,5g de sílica. O material foi agitado em “bead beating” (Biospec products) por 30s, para lise da parede celular. O DNA então foi extraído com fenol/clorofórmio 1:1 e precipitado com isopropanol e NaCl (5 M). A lavagem do DNA realizada com etanol 70%, seco a 37° C. Após a ressuspensão do material em 50µL de água Milli-Q, o DNA foi estocado a -20° C. Todas as amostras tratadas com RNase (10 mg ml⁻¹). A concentração do DNA foi estimada em minigel de agarose 1,0%, com os padrões conhecidos para sua posterior utilização nas reações de PCR (*polymerase chain reaction*).

4.2.2 Reação da polimerase em cadeia (PCR) e Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA).

O gene 16S rRNA foi amplificado com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores para o domínio *Eubacteria* fD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e rD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3') (WEISBURG et al., 1991). As amplificações do gene 16S rRNA foram realizadas em volume final de 25µL contendo 5pmols de oligonucleotídeos iniciadores, 200µM de cada dNTP, 1 X tampão *Taq*, 1,5 mM de MgCl₂, 2 U Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil) e 10 ng de DNA. A reação foi iniciada com 3 minutos de desnaturação a 94° C, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94° C por 1 min, anelamento a 55° C por 30 segundos, extensão a 72° C por 30 seg, e extensão final a 72° C por 10

minutos. Uma alíquota de 5µL do produto da PCR foi analisada em gel de agarose 1%, utilizando como padrão de tamanho de DNA o marcador molecular Low mass (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil). Os géis foram documentados através do programa “Multi Analyst” do “Fluor-STM Multimager” (BioRad, Hercules, Califórnia, E.U.A).

As reações de digestão foram realizadas utilizando aproximadamente 500ng do produto de PCR resultante da amplificação do gene 16S rRNA universal purificado, 2,0µL do tampão da enzima, 0,3µL da enzima de restrição (10 U µl⁻¹) em volume final de 20µL. As reações foram incubadas a 37° C por 3 h para a enzima *Msp* I e a 65° C para a enzima *Taq* I. Todo o produto de PCR foi analisado em gel de agarose 2%, utilizando como padrão de tamanho de DNA o marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen Life Technologies). Os géis foram documentados pelo do programa “Multi Analyst” do “Fluor-STM Multimager” (BioRad, Hercules, Califórnia, E.U.A). Enzimas de restrição (endonucleases) utilizadas neste estudo, com suas respectivas seqüências de corte:



4.2.3 Sequenciamento do Gene 16S rRNA e Análise Filogenética das Seqüências dos Isolados

A PCR de sequenciamento dos fragmentos foi feita através do Kit de sequenciamento DYEnamic ET Terminator Cycle (Amersham Biosciences, Inglaterra, UK). A reação foi para um volume final de 10µL onde foram utilizados 200ng dos fragmentos; 5pmoles de oligonucleotídeos iniciadores; 2,0µL de tampão 2,5 X; 2,0µL de DYEnamic ET Terminator Cycle. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram: rD1 e fD1, além dos conjuntos de oligonucleotídeos internos descritos na tabela 2, visando o fechamento da seqüência do gene 16S rRNA. As condições de amplificação para o iniciador T7 foram: 2 min de desnaturação a 96° C, seguidos de 25 ciclos com desnaturação a 96° C por 45 segundos, anelamento a 50° C por 30

segundos, extensão a 60° C por 4 min., enquanto que para os demais iniciadores tais condições encontram-se a seguir: 4 min. de desnaturação a 94° C, seguidos de 25 ciclos com desnaturação a 94° C, por 1 min.; anelamento a 55° C por 30 seg. e extensão a 60° C por 4 min.

Tabela 2. - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores internos para amplificação do gene 16S rRNA (Lane, D. J., 1991).

<i>Seqüência (5'-3')</i>	<i>Posição de alinhamento na seqüência de E. coli</i>
CCT ACG GGA GGC AGC AG	341-357F
CTG CTG CCT CCC GTA GG	357R
GTA G(GC)G GTG AAA T(GC)C GTA GA	685 -704F
TCT ACG SAT TTC ACC (GC) CT AC	704R
GCA ACG AGC GCA ACC C	109 9 -1114F
GGG TTG CGC TCG TTG C	1114R

Após a amplificação dos fragmentos de interesse, procedeu-se a precipitação para a eliminação dos dNTPs que não foram incorporados. Foi adicionado 1µL de tampão acetato de sódio/EDTA, mais 40µl etanol a 95% (recém preparado). Após a homogeneização por agitação, os tubos foram centrifugados a 12.000rpm, por 15 min., a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 500µl de etanol 70% foram adicionados. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 5min. a 12.000rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado incubado por 5min. a 40° C para secagem. Em seguida o precipitado foi ressuspensionado em 10µl de formamida (HiDi formamida – Applied Biosystems) em microplacas. A microplaca foi colocada em um termociclador para desnaturação do DNA a 96° C durante 5 min. e imediatamente colocado no gelo por 2 minutos. A leitura das bases marcadas foi realizada no Sequenciador Automático ABI Prism 3100 Genetic Analyser do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – CENA/USP. As seqüências geradas foram editadas removendo as bases de baixa qualidade (<20) através dos programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux (Ewing & Green, 1998; Ewing et al., 1998; Gordon et al., 1998). As seqüências foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), website em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 20 jun. 2007.

4.3 Extração do DNA total do solo e Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Para a extração de DNA total foi utilizado o kit Power Soil (MoBio) seguindo as recomendações do fabricante. Para cada sítio e profundidade trabalhou-se com três repetições para a extração. A quantificação foi realizada através do fluorímetro DyNA Quant2000 (Amersham Pharmacia Biotech UK, Ltd., Buckinghamshire, United Kingdom). Cinco microlitros do DNA foram analisados em gel de agarose 1%, utilizando como padrão de tamanho de DNA o marcador molecular Low Mass DNA Ladder - (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil). Os géis foram documentados utilizando-se o programa “Multi Analyst” do “Fluor-S TM Multimager” (BioRad, Hercules, Califórnia, E.U.A.).

Para a primeira amplificação de DGGE foram utilizadas alíquotas de 10ng do DNA total diluído e a reação calculada para volume final de 25µl com primers universais para bactéria 16S forward (FD1) (5'CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCAG3') e 16S reverse (RD1) (5' CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC3') (LANE et al., 1991; WEISBURG et al., 1991).

As condições para a primeira amplificação foram as seguintes: 5pmols de oligonucleotídeos iniciadores, 200mM de cada dNTP (adenina, citosina, timina e guanina), 1 X tampão *Taq*, 1,5mM de MgCl₂, 2U Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Sao Paulo, Brasil). A PCR foi iniciada com 3 minutos de desnaturação a 94° C, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94° C por 1 min, anelamento a 55° C por 30 segundos, extensão a 72° C por 30 seg, e extensão final a 72° C por 10 minutos. Processada em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700-Applied Biosytem. Uma alíquota de 5µL do produto da PCR foi analisada em gel de agarose 1%, para confirmar amplificação utilizando como padrão de tamanho de DNA o marcador molecular 100pb (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil). Os géis foram documentados através do programa “Multi Analyst” do “Fluor-STM Multimager” (BioRad, Hercules, Califórnia, E.U.A.).

Na segunda amplificação (“*nested*”), a reação de PCR para amplificação do fragmento de interesse foi realizada segundo os parâmetros: o volume final para amplificação foi de 50µl contendo os iniciadores específicos para o gênero *Burkholderia* BurkR reverse (5’ TGC CAT ACT CTA GCY YGC 3’), e Burk3- “*clamp*” (5’ CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG CTG CGA AAG CCG GAT 3’) na concentração de 7,5pmols de oligonucleotídeos iniciadores 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (adenina, citosina, timina e guanina), 1,2 unidades de *Taq* DNA polimerase e 1µl dos amplicons resultantes da primeira reação. As condições de PCR foram as seguintes: 3 minutos de desnaturação a 94° C, seguido de 25 ciclos com desnaturação a 94° C por 1 min, anelamento a 56° C por 30 segundos, extensão a 72° C por 30 seg, e extensão final a 72° C por 10 minutos. Todas as reações incluíram pelo menos um controle positivo (padrões Embrapa Agrobiologia – RJ) e um controle negativo (amostra sem adição de DNA). A quantificação foi feita como descrito acima e uma alíquota dos produtos da reação de polimerase em cadeia (PCR) foram então analisadas através de Eletroforese em Gel de Poliacríamida com Gradiente Desnaturante (DGGE).

Para a análise em gel DGGE, utilizamos como referência as seguintes estirpes padrões: (TVV 75) - *Burkholderia vietnamiensis*; (BR 11897) - *Burkholderia kuruiensis*; (MTI 641) - *Burkholderia unamae*; (BR3487) - *Burkholderia tuberum*; (BR 3486) - *Burkholderia phymatum*; (LMG 18531) - *Burkholderia caribensis*; (BR 11366) - *Burkholderia tropica*; (BR 11340) - *Burkholderia brasiliensis* e (BR 11907) - *Burkholderia silvatlantica*. (EMBRAPA-CNPAB). De acordo com o padrão de clivagem obtido no o gel de DGGE foi possível selecionar algumas estirpes como padrão M₁ (TVV 75, BR 11907) e M₂ (LMG 18531 e BR 3487).

4.3.1 Análise dos amplicons do rDNA 16S por Eletroforese em Gel de Poliacrílamida Desnaturante (DGGE)

A análise por DGGE, baseada no método descrito por Muyzer et al. (1993), foi realizada no sistema Phor U2 (Ingeny, Goes, The Netherlands). Os produtos de PCR foram quantificados e

uma alíquota com aproximadamente 500ng de DNA então colocados em gel de poliacrilamida (6% acrilamida) vertical, com um gradiente de uréia/formamida (45% a 65%), onde 100% de desnaturação apresenta 7M de uréia e 80% de formamida. Foi aplicada uma corrente elétrica de 200 volts por 5 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com SYBR Green (Gold Nucleic Acid Gel Stain; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) diluído em tampão 1x TAE, observado sobre luz ultravioleta e fotodocumentado utilizando-se o programa “Multi Analyst” do “Fluor-STM Multimager” (BioRad, Hercules, Califórnia, E.U.A).

Após análises por DGGE as bandas de interesse foram selecionadas e retiradas do gel com lâmina de bisturi esterilizada e eluídas em 10µL de água ultrapura, por aproximadamente 16 horas a 4° C. Depois de centrifugadas por 1 min, alíquotas de 2µL do DNA foram separadas para reamplificação com o mesmo conjunto de primers BurkR reverse (5' TGC CAT ACT CTA GCY YGC 3') e Burk3 (5' CTG CGA AAG CCG GAT 3'). O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1%, para confirmar amplificação utilizando dos marcadores descritos acima.

4.3.2 Purificação dos fragmentos amplificados

A purificação do DNA foi efetuada da seguinte forma: Todo o volume do produto de PCR (20µL) foi transferido para tubos Eppendorf de 500µL e adicionados 60µL de isopropanol 100% e 20µL de água ultrapura (Ex: milli-Q) autoclavada. A mistura foi homogeneizada (vórtex) por alguns segundos e deixado em repouso por 2h a -20° C; em seguida foi centrifugada a 14.000 rpm por 25 min, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado totalmente com micropipeta (P 200) e adicionado 150µL de etanol 70% (diluído em água ultrapura imediatamente antes de usar). Homogeneizou-se (vórtex) por alguns segundos e centrifugou-se a 14.000rpm, por 5 min, a temperatura ambiente; o sobrenadante foi descartado totalmente com micropipeta (P 200 e P 10); o precipitado foi seco no concentrador de DNA (Eppendorf 5301) por 10 min e ressuspenso em 50µL de água ultrapura autoclavada, agitou-se em vórtex seguido de um pulso na microcentrífuga; o material foi colocado (5µL) em gel de agarose 1% e o restante foi guardado em freezer -20° C até a próxima etapa, reação de sequenciamento.

4.3.3 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

A PCR de sequenciamento dos fragmentos amplificados com o recorte das bandas foi feita através do Kit de sequenciamento DYEnamic ET Terminator Cycle (Amersham Biosciences, Inglaterra, UK). A reação foi para um volume final de 10 μ L onde foram utilizados 200ng dos fragmentos; 7,5pmoles de oligonucleotídeos iniciadores; 2,0 μ L de tampão 2,5 X; 3,0 μ L de DYEnamic ET Terminator Cycle. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram: *BurkR* e *Burk3*. As condições de amplificação para os iniciadores “Burk” foram: 2 min de desnaturação a 96° C, seguidos de 25 ciclos com desnaturação a 96° C por 45 segundos, anelamento a 56° C por 30 segundos, extensão a 60° C por 4 minutos.

Após a amplificação dos fragmentos de interesse, procedeu-se a purificação segundo as seguintes condições: Foi adicionado 2 μ L acetado sódio/EDTA e 60 μ L de etanol absoluto, homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e 150 μ L de etanol 70% foram adicionados e novamente centrifugados por 5 min a 14.000rpm, o sobrenadante descartado, e o precipitado incubado por 10 minutos a 40° C para secagem. Em seguida o precipitado foi ressuspendido em 10 μ L de formamida (HiDi formamida – Applied Biosystems). A leitura das bases marcadas foi realizada no Sequenciador Automático ABI Prism 3100 Genetic Analyser do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – CENA/USP.

4.3.4 Análises das Seqüências

As seqüências nucleotídicas obtidas foram processadas pela remoção de bases com baixa qualidade. Com os programas Phred/Phrap/Consed (Ewing & Green, 1998; Ewing et al., 1998; Gordo et al., 1998) foram montados contigs. O PHRED verifica a qualidade do seqüenciamento de cada base das várias seqüências e junto ao PHRAP fazem o alinhamento de todos os clones, construindo uma seqüência contínua, ou contig. Esse análise foi realizada em sistema operacional linux. Com os resultados foi processada uma análise comparativa das seqüências em

bancos de dados internacionais Gen Bank do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Utilizando a ferramenta BLASTn (Altschul et al., 1990) visando a identificação dos microrganismos.

Através deste algoritmo pode-se comparar uma seqüência de DNA qualquer com todas seqüências genômicas de domínio público. Desta forma várias regiões de DNA podem ser anotadas através do BLAST, cujo resultado pode servir para identificação do organismo através da seqüência do gene 16S rRNA pesquisada que apresenta homologia significativa a outras seqüências previamente depositadas no GenBank.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento, ARDRA e sequenciamento do gene 16S rRNA

Trabalhos sobre a diversidade microbiana em áreas de TPA indicam que este tipo de solo pode ser considerado um sítio de alta diversidade, constituindo-se numa fonte de germoplasma microbiano (TSAI et al., 2003), isso pode ser esclarecido devido as altas concentrações de matéria orgânica estável presente nesses solos. Porém, informações sobre populações de bactérias do gênero *Burkholderia* em solos da região Amazônica nos sítios de Terra Preta Arqueológica do tipo sambaqui e solos de floresta nativa natural são inéditos. Os resultados obtidos nesse estudo levantam um grande potencial para estudos futuros em áreas ainda pouco exploradas, visto que o gênero precisa ser melhor caracterizado, de tal forma que novos componentes estão sendo frequentemente propostos.

Foram isoladas 55 colônias de bactérias em solo de Terra Preta Arqueológica (TPA) e 100 isolados em solo de Floresta Nativa Natural (FN), totalizando 155 isolados estudados. Para seleção prévia, utilizou-se da técnica de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) para detectar variabilidade genética entre os isolados obtidos (figura 7 a 9), de onde

foram selecionados 50 estirpes para o sequenciamento. De acordo com o padrão de clivagem, foi possível observar de 2 a 4 fragmentos por enzima de restrição, e apenas os fragmentos com tamanho acima de 100 pb foram considerados na presente análise.

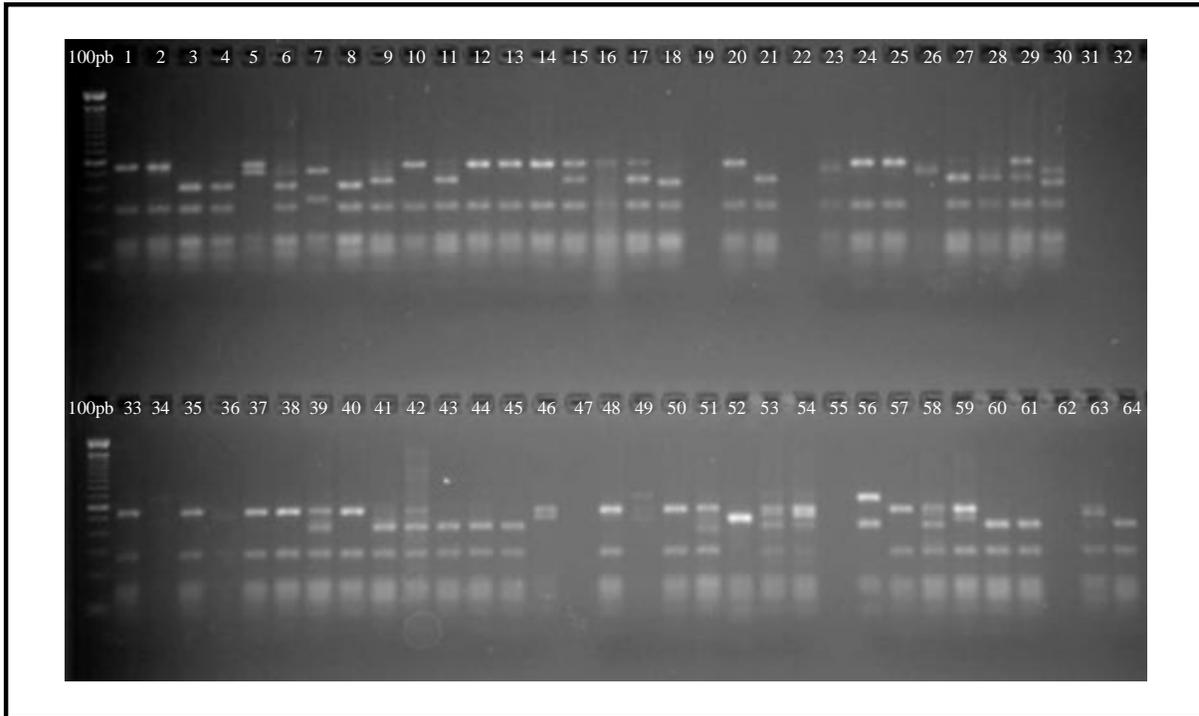


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Msp* I após a amplificação do gene 16S rRNA dos isolados. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados de Terra Preta Arqueológica (1 a 32) e Solo de floresta nativa natural (33 a 64), adjacente à TPA.

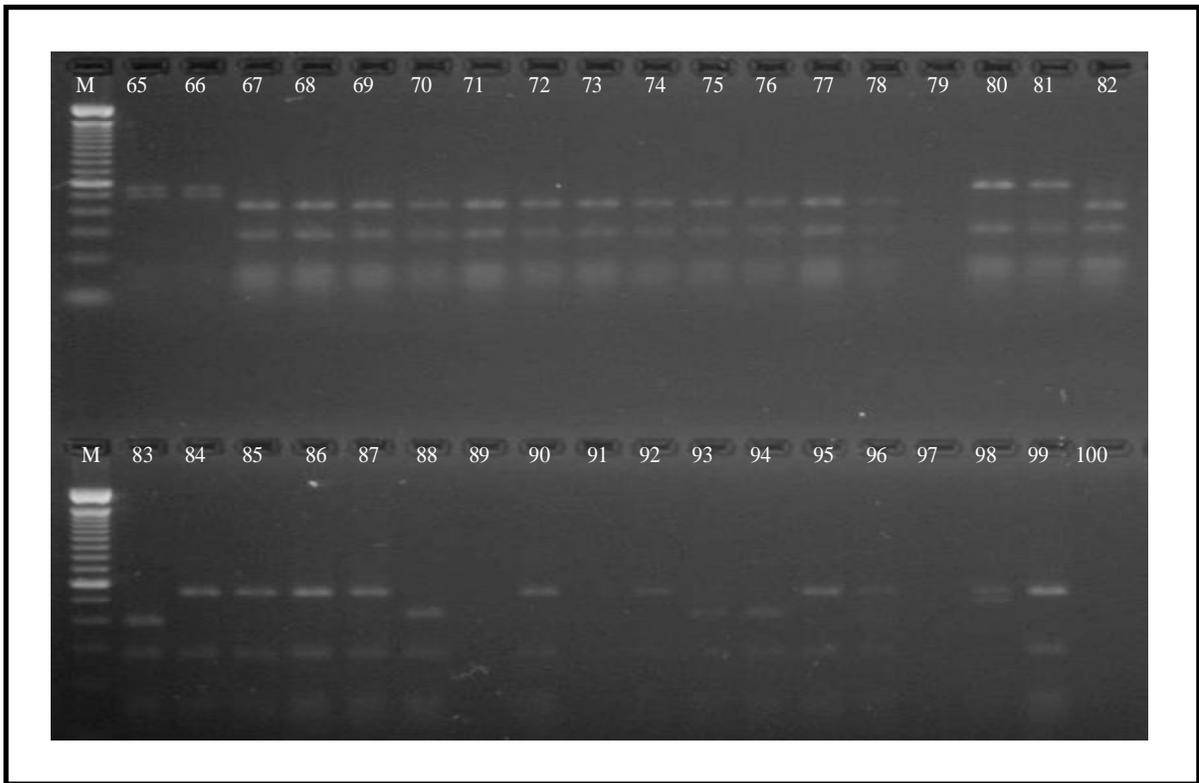


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Msp* I após a amplificação do gene 16S rRNA dos isolados. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados de Terra Preta Arqueológica (65 a 82) e Solo de floresta nativa natural (83 a 100), adjacente à TPA.

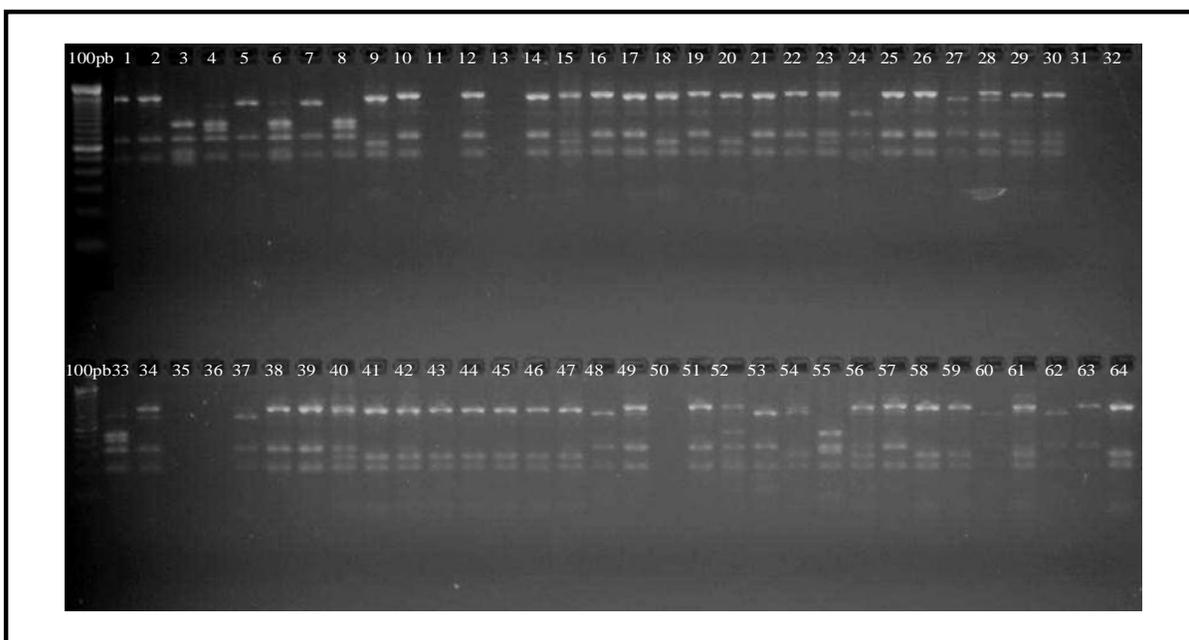


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Msp* I após a amplificação do gene 16S rRNA dos isolados. M – marcador molecular 1Kb Ladder. Os números acima das canaletas correspondem aos isolados de Solo de floresta nativa natural (101 a 155), adjacente à TPA.

As seqüências geradas pelo sequenciamento foram editadas removendo-se as bases de baixa qualidade (<20), e então analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI. Alguns isolados não apresentaram identidade ($\geq 98\%$) frente ao banco de dados, que supostamente podem ser seqüências de microrganismos ainda não depositados, visto que o gênero ainda é pouco conhecido. Além da rica diversidade em solo de floresta, observou-se nas amostras coletadas a ocorrência de bactérias não cultivadas, o que indica a importância da exploração desse conhecimento na região.

A partir dos dados gerados pelo sequenciamento, foi construída uma tabela (tabela 3) que reuniu características dos isolados, como por exemplo o local de isolamento, o número de acesso no GenBank (website em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 20 Ago. 2007.), o tamanho do fragmento seqüenciado e a percentagem de similaridade das seqüências.

Tabela 3 - Estirpes isoladas de amostras do sítio de Terra Preta Arqueológica tipo sambaqui (TPA) e solo de Floresta nativa Natural (FN) nas profundidades de 10, 20, 30 e 40 cm.

Amostra	Organismo	Ambiente e Autor	n° Acesso	pb	%	e-value
TPA 10	<i>Burkholderia cepacia</i>	Solo, Japão. Kang, H.G. (NCBI)	AF508806	1444	99%	0.0
TPA 10	<i>Xylophilus ampelinus</i>	Solo, Austrália. Wen, A. et al., 1999.	AF078758	1470	97%	0.0
TPA 10	<i>Pseudomonas</i> sp. WAB1930	Patogênico, Brasil. Abraham, W.R. (NCBI)	AM184269	1427	99%	0.0
TPA 10	<i>Labrys ginsengisoli</i>	Solo. Im, W.T. & Lee, S.T. (NCBI)	AB271044	1434	98%	0.0
TPA 10	<i>Uncultured bacterium clone</i>	Solo. Dekas, A. (NCBI)	DQ532183	1227	98%	0.0
TPA 10	<i>Variovorax koreensis strain2</i>	Solo experimental, Coreia. Kim, B.Y., 2006.	DQ432053	1260	84%	0.0
TPA 10	<i>Pseudomonas putida</i>	Solo. Fedrizzi, S.G. (NCBI)	EF529517	1374	98%	0.0
TPA 20	<i>Alpha proteobacterium</i>	Sedimento, Portugal. Carvalho, M.F. et al., 2005.	AY362040	1465	99%	0.0
TPA 20	<i>Serratia marcescens</i>	Solo, água. China. Zhu, k. et al., 2007.	EF208030	1446	99%	0.0
TPA 20	<i>Serratia marcescens</i>	Coleção cultura, China. Zhu, H. et al., (NCBI)	EF208030	1445	99%	0.0
TPA 20	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Copeland, A. et al., (NCBI)	CP0000459	1308	99%	0.0
TPA 20	<i>Variovorax paradoxus</i>	Solo. Maimaiti, J. et al., (NCBI)	DQ256487	1477	99%	0.0
TPA 30	<i>Burkholderia</i> sp.	Copeland, A. et al., (NCBI)	CP000152	1440	99%	0.0
TPA 30	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Copeland, A. et al., (NCBI)	CP000459	1452	99%	0.0
TPA 30	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	Copeland, A. et al., (NCBI)	CP000614	1434	99%	0.0
TPA 30	<i>Burkholderia</i> sp.	Leguminosa, Taiwan. Chen, W. et al., 2003.	AJ505301	1441	99%	0.0
TPA 40	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	Copeland, A. et al., (NCBI)	CP000614	1396	99%	0.0
TPA40	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Copeland, A. et al., (NCBI)	CP000094	1486	98%	0.0
TPA 40	<i>Burkholderia hospita</i>	Leguminosa. Mohseni, M. (NCBI)	DQ855427	1338	98%	0.0
TPA 40	<i>Burkholderia</i> sp.	Mimosa. Austrália. Parker, M.A. (NCBI)	DQ156081	1452	98%	0.0
FN 10	<i>Dyella japonica</i>	Solo, Japão. Xie, C.H. & Yokota, A., 2005.	AB110496	1445	99%	0.0
FN 10	<i>Burkholderia</i> sp.	Nódulos. Rasolomam, R. et al., 2005.	CP000150	1443	99%	0.0
FN 10	<i>Burkholderia cepacia</i>	Floresta tropical. Hashidoko, Y. (NCBI)	AB252073	1326	98%	0.0
FN 10	<i>Ralstonia eutropha HI6</i>	Leguminosa, Taiwan. Chen, W. et al., 2005.	AM260479	1391	99%	0.0
FN 10	<i>Burkholderia</i> sp.	Leguminosa, Taiwan. Chen, W. et al., 2003.	AJ505301	1490	94%	0.0
FN 10	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	Cana de açúcar, Brasil. Perin, L. et al., 2006.	AY965240	1476	99%	0.0

continua

continuação

Amostra	Organismo	Ambiente e Autor	n° Acesso	pb	%	e-value
FN 20	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	Cana de açúcar, Brasil. Perin, L. et al., 2006.	AY965240	1359	99%	0.0
FN 20	<i>Burkholderia cepacia</i>	Floresta Tropical. Hashidoko, Y. (NCBI)	AB252073	1394	99%	0.0
FN 20	<i>Burkholderia hospita</i>	Biorremediação. Mohseni, M. (NCBI)	DQ855427	1427	98%	0.0
FN 20	<i>Burkholderia caribensis</i>	Cana de açúcar, Brasil. Reis, V.M. (NCBI)	AY586519	1417	99%	0.0
FN 20	<i>Uncultured bacterium clone</i>	Solo. Dunn, A.K. & Stabb, E.V., 2005.	DQ068845	1209	99%	0.0
FN 20	<i>Burkholderia terrae</i>	Solo de floresta, Coreia. Yang, H.C., 2006.	AB201285	1478	98%	0.0
FN 20	<i>Variovorax paradoxus</i>	Solo. Maimaiti, J. (NCBI)	DQ256487	1483	100%	0.0
FN 20	<i>Burkholderia</i> sp. TJ182	Leguminosa, Taiwan. Chen, W.M., 2003.	AJ505301	1439	99%	0.0
FN 20	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Copeland, A. et al. (NCBI)	CP000458	1485	99%	0.0
FN 20	<i>Uncultured bacterium clone</i>	Solo. Dunn, A.K. & Stabb, E.V., 2005.	DQ068845	1309	99%	0.0
FN 20	<i>Burkholderia</i> sp.	Leguminosa, Taiwan. Chen, W.M., 2003.	AJ505301	1369	99%	0.0
FN 30	<i>Dyella japonica</i> gene	Solo. Xie, C.H. & Yokota, A. (NCBI)	AB110496	1484	99%	0.0
FN 30	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	Cana de açúcar, Brasil. Perin, L. et al., 2006.	AY154379	1309	99%	0.0
FN 30	<i>Burkholderia</i> sp. 383	Copeland, A. et al., (NCBI)	CP000152	1433	99%	0.0
FN 30	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Copeland, A. et al., (NCBI)	CP000458	1365	97%	0.0
FN 30	<i>Burkholderia sacchari</i>	Cana de açúcar, Brasil. Bramer, C.O, et al., 2005.	AF263278	1444	97%	0.0
FN 40	<i>Stenotrophomonas altophilia</i>	Tanaka, N., (NCBI)	AB294553	1421	96%	0.0
FN 40	<i>Burkholderia xenovorans</i>	Biorremediação. Caballero-Mellado, J. (NCBI)	EF139188	1432	98%	0.0
FN 40	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Copeland, A. et al., (NCBI)	CP000458	1131	99%	0.0
FN 40	<i>Burkholderia cepacia</i>	Floresta tropical. Hashidoko, Y. (NCBI)	AB252073	1326	98%	0.0
FN 40	<i>Variovorax paradoxus</i>	Solo. Maimaiti, J. (NCBI)	DQ256487	1368	99%	0.0
FN 40	<i>Burkholderia caribiensis</i>	Leguminosa, Taiwan. Chen, W.M., 2003.	Y17009	1437	100%	0.0

No gênero *Burkholderia* ocorrem tanto espécies benéficas, capazes de fixar nitrogênio, produzir fitormônios, como apresentada pela *B. tropica* (REIS, 2004) e outras espécies (MOULIN et al., 2001; CHEN et al., 2003), quanto espécies patogênicas, tanto para plantas quanto animais, como por exemplo, a *Burkholderia. cepacia*.

Algumas estirpes obtidas a partir do isolamento com meio de cultivo JMV (BALDANI et al. 1996), são descritas como representantes de um grupo com amplo potencial na microbiota do solo, muitas delas são comumente associadas à fixação biológica de nitrogênio. *B. silvatlantica*, foi inicialmente identificada em plantas de cana de açúcar, milho e abacaxi (L. PERIN et al., 2006). Outra espécie de reconhecida importância na microbiota do solo é a espécie *B. vietnamiensis*, considerada a primeira do gênero com capacidade de fixação biológica do nitrogênio, isolada por Gilles et al., (1995) da rizosfera de raízes de arroz cultivado no Vietnã. Outras espécies como *B. nodosa*, *B. cepacia*, *B. hospita* e *B. caribiensis* encontradas em áreas de Floresta Nativa Natural também descritas como fixadoras de nitrogênio (CHEN, W. M. et al., 2005). Foram isoladas 20 estirpes identificadas como *B. cepacia*, inicialmente classificada como patogênica, causadora do apodrecimento da casca de cebola (BURKHOLDER, 1950), e atualmente caracterizada por uma ampla escala de funções, como por exemplo, a fixação biológica do nitrogênio e a patogenicidade em humanos (BEVIVINO et al., 1994).

Gomes et al. (1996) identificaram *Burkholderia sacchari*, como estirpe com grande potencial para a indústria. São responsáveis pela produção e acúmulo de polihidroxialcanoatos (PHAs), polímeros com propriedades plásticas (BRAMER et al., 2001). Pesquisadores do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) consideram que a diferença dessas bactérias em relação a outras utilizadas na obtenção industrial do PHA, é sua capacidade de produzir o polímero a partir da sacarose, um açúcar de baixo custo no Brasil, onde há grandes áreas de canaviais.

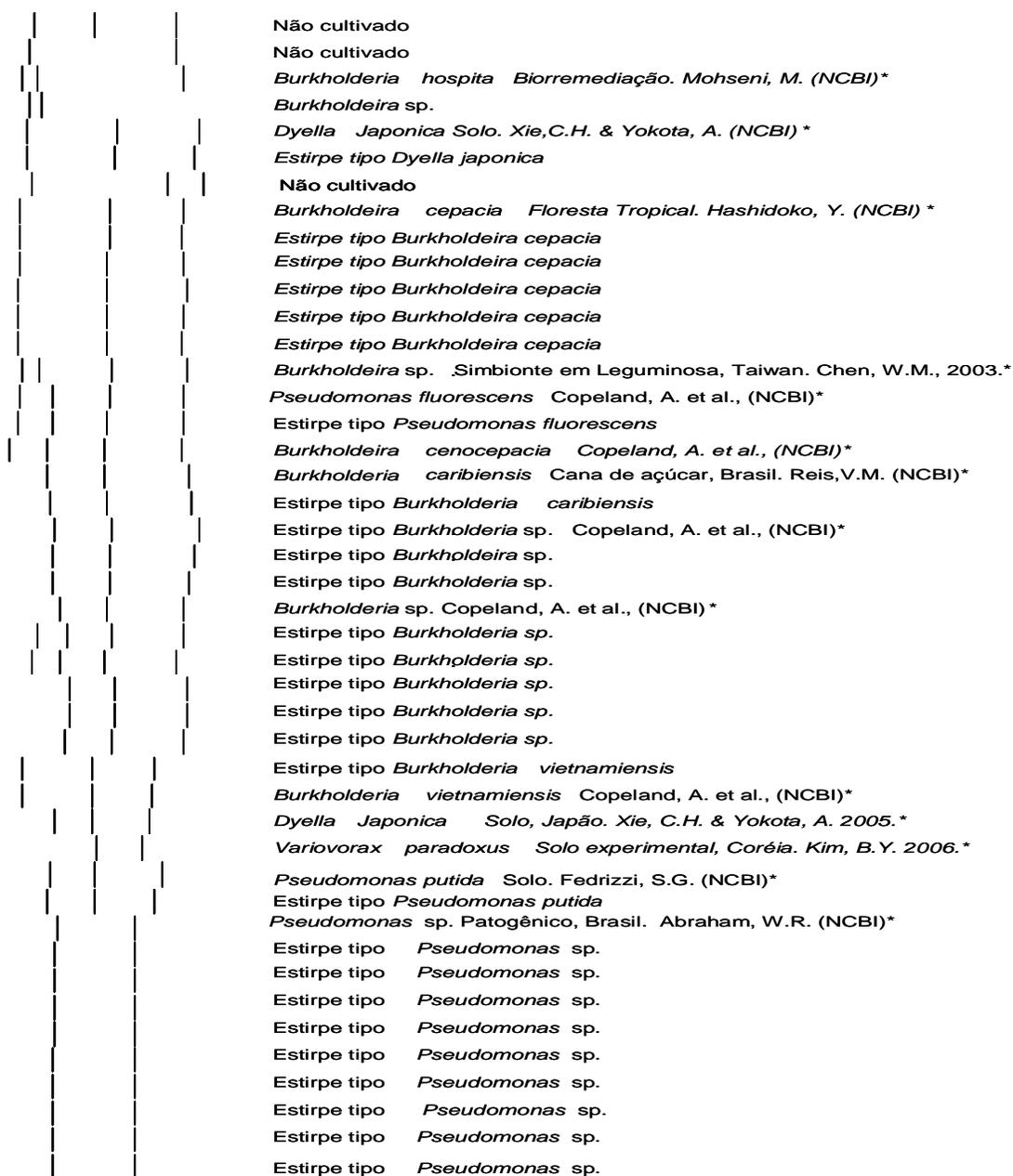


Figura 9 - Análise por ARDRA, produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Msp* I após a amplificação do gene 16S rRNA. Estirpes isoladas de amostras de TPA (* isolados seqüenciados).

Burkholderia sp. Simbionte Leguminosa, Chen, W. et al., 2005.*
 Estirpe tipo *Burkholderia* sp.
 Estirpe tipo *Burkholderia* sp.
 Estirpe tipo *Burkholderia* sp.
 Estirpe tipo *Burkholderia* sp.
Burkholderia sacchari Cana de açúcar Bramer, C. O, et al., 2005.*
Burkholderia hospita Biorremediação. Mohseni, M. (NCBI)*
 Não cultivado
 Não cultivado
Ralstonia eutropha Simbionte Leguminosa, Taiwan. Chen, W. et al., 2003.*
 Estirpe tipo *Ralstonia eutropha*
 Estirpe tipo *Ralstonia eutropha*.
 Não cultivado
Variovorax paradoxus Maimaiti, J. (NCBI)*
 Estirpe tipo *Variovorax paradoxus* .
 Estirpe tipo *Burkholderia* sp.
 Não cultivado
 Não cultivado
 Não cultivado
 Não cultivado
Burkholderia sp. Simbionte em Leguminosa, Taiwan. Chen, W. M., 2003.*
 Estirpe tipo *Burkholderia* sp.
Burkholderia sp. Cipeland, A. et al., (NCBI)*
 Estirpe tipo *Burkholderia* sp.
 Estirpe tipo *Burkholderia* sp.
Burkholderia silvatlantica Diazotrófica em cana de açúcar, Brasil. Perin, L. et al., 2006.*
 Estirpe tipo *Burkholderia silvatlantica*
 Estirpe tipo *Burkholderia silvatlantica*
 Estirpe tipo *Burkholderia silvatlantica*
Burkholderia xenovorans Biorremediação. Caballero-Mellado, J. (NCBI)*
 Estirpe tipo *Burkholderia xenovorans* .
 Estirpe tipo *Burkholderia xenovorans*
 Estirpe tipo *Burkholderia cepacia*
Burkholderia cepacia Floresta Tropical, Hashidoko, Y. (NCBI)*
 Estirpe tipo *Burkholderia cepacia*
 Estirpe tipo *Burkholderia cepacia*
 Estirpe tipo *Burkholderia* sp.
 Estirpe tipo *Burkholderia* sp.
Burkholderia caribensis cana de açúcar, Brasil. Reis, V.M. (NCBI)*
 Estirpe tipo *Burkholderia caribensis*
 Estirpe tipo *Burkholderia caribensis*
 Estirpe tipo *Burkholderia caribensis*
 Estirpe tipo *Burkholderia caribensis*
 Estirpe tipo *Burkholderia terrae*
 Estirpe tipo *Burkholderia terrae*
Burkholderia terrae Solo de floresta, Corpeia. Yang, H. C., 2006.*
Burkholderia cenocepacia Copeland, A. et al, (NCBI)*
 Estirpe tipo *Burkholderia* sp.
Burkholderia sp. Nódulos. Rasolomam, R. et al., 2005.*
 Estirpe tipo *Burkholderia* sp.
 Estirpe tipo *Burkholderia* sp.
Stenotrophomonas altophiilia. Tanaka, N. (NCBI)*
 Não cultivado

Figura 10 - Análise por ARDRA, produtos de digestão enzimática com a endonuclease *Msp* I após a amplificação do gene 16S rRNA. Estirpes isoladas de amostras de FN (* isolados seqüenciados).

Por meio da análise dos produtos de restrição dos isolados com endonucleases específicas, foram gerados perfis distintos para os fragmentos. Foram testadas 3 enzimas de restrição, e a *MspI* foi selecionada para análise devido ao seu alto poder discriminativo.

Analisando-se a figura 9 obtida para as amostras de TPA, observou-se a formação de dois grupos distintos, reunindo estirpes de *Burkholderia* e *Pseudomonas*, respectivamente. Os isolados da espécie *cepacia* foram representativos, da mesma forma que as estirpes de *Pseudomonas* sp. A grande maioria dos grupos formados reuniu as estirpes previamente seqüenciadas, mostrando diversidade e número de indivíduos inferior em comparação à floresta nativa (figura 10). Nessa foram reunidos a maior diversidade de espécies *Burkholderia*. Na FN não foi possível encontrar isolados de *Pseudomonas*, sendo a extensa maioria composta por *Burkholderia* e alguns outros gêneros bacterianos mais diversos.

5.2 Extração de DNA total do solo e análise por DGGE

Foi realizada extração de DNA para cada amostra de Terra Preta Arqueológica (TPA) e solo de floresta nativa natural nas profundidades de 10, 20, 30, 40cm em triplicatas (a, b, c). Tal procedimento foi adotado para que a comunidade bacteriana estudada fosse altamente representativa, uma vez que o ambiente solo é muito heterogêneo. O DNA foi quantificado através do fluorímetro DyNA Quant2000 (Amersham Pharmacia Biotech UK, Ltd., Buchinganshire, United Kingdom) e 5µl analisado em gel de agarose 1% utilizando como padrões de massa molecular Low mass DNA Ladder - (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil), podemos verificar no gel a presença de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) “bandas” mais intensas, sugerindo uma maior quantidade de DNA nas primeiras profundidades. O DNA posteriormente foi diluído para padronização num total de 10ng/µl. (Laboratório Zootecnia de Não Ruminantes. ESALQ/USP).

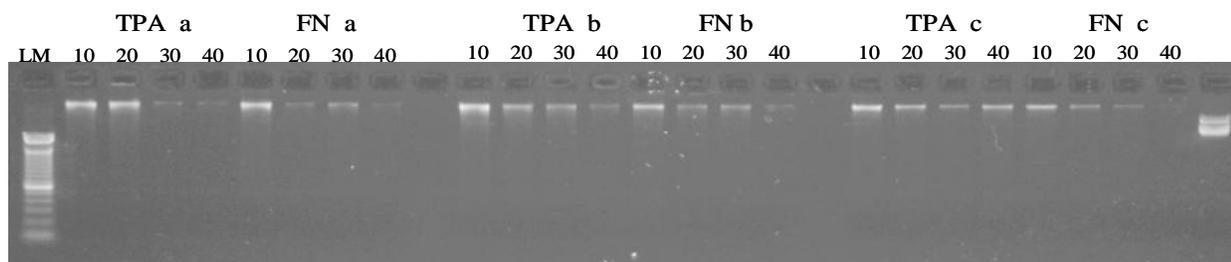


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1% com DNA total do solo. Amostras de Terra Preta (TPA) e Solo de Floresta Natural (FN). LM- low mass DNA Ladder - (Invitrogen), os números (10, 20, 30, 40) acima das canaletas correspondem as profundidades em cm e as letras (a, b, c) correspondem as repetições.

O DNA total das amostras foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores 16S rRNA para o Domínio Eubactéria fD1 e rD1. Os produtos de PCR de todas as amostras foram quantificados e então realizada a amplificação do DNA alvo com primers específicos para o gênero *Burkholderia BurkR* e *Burk3-clamp*, produzindo uma banda única em torno de 600pb para todas as amostras testadas.

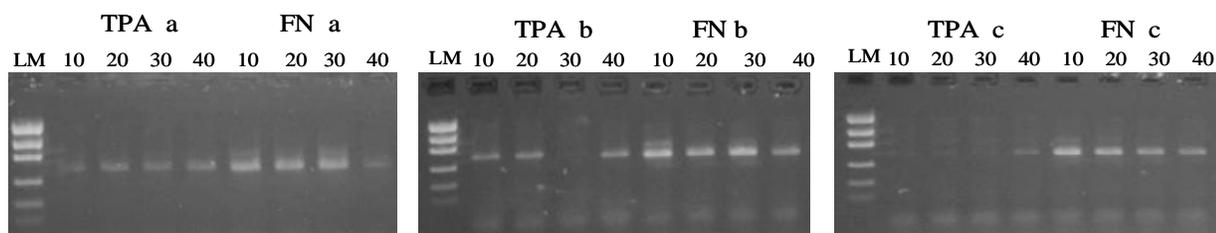


Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1% com produto de amplificação (oligonucleotídeos iniciadores específicos *BurkR* e *Burk3-clamp*). LM- low mass DNA Ladder - (Invitrogen) . Amostras de Terra Preta (TPA) e Solo de Floresta Natural (FN). Os números acima das canaletas correspondem a profundidades e as letras correspondem a repetições.

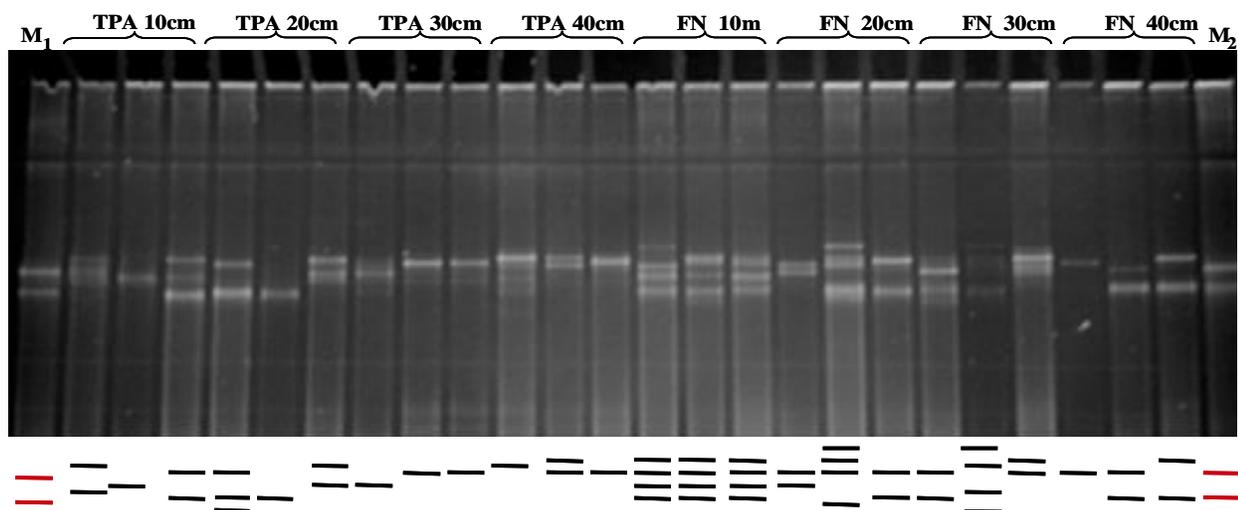


Figura 13 - Diversidade de bactérias do gênero *Burkholderia* detectada em gel de DGGE, utilizando amostras de sítio TPA MINAI e solo de floresta nativa natural nas profundidades de 10, 20, 30, 40 cm. M₁ e M₂ são padrões conhecidos. M₁ (TVV 75 - *Burkholderia vietnamiensis*; BR 11907 - *Burkholderia silvatlantica*), M₂ (BR 11340 - *Burkholderia brasiliensis*; BR3487 - *Burkholderia tuberum*).

A figura 13 mostra a separação de amplicons específicos para o gênero *Burkholderia*, obtidos a partir da técnica de Eletrofose em Gel de Poliacrilamida Desnaturante (DGGE). Existe uma grande variação na distribuição das UTOs encontradas. Podemos verificar que a maior parte dos UTOs está presente em solo de floresta nativa natural quando comparadas as amostras de TPA. O número de UTOs por amostra está relacionada ao fator profundidade, por exemplo, as menores profundidades estão sendo representadas por até quatro UTOs, enquanto que para as profundidade de 30 e 40cm observamos apenas duas.

Os perfis obtidos no gel de poliacrilamida foram analisados através do programa “BioNumerics” (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica) para a construção de relações filogenéticas (dendrogramas), pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with arithmetic means, Sneath & Sokal, 1973) e coeficiente de Jaccard.

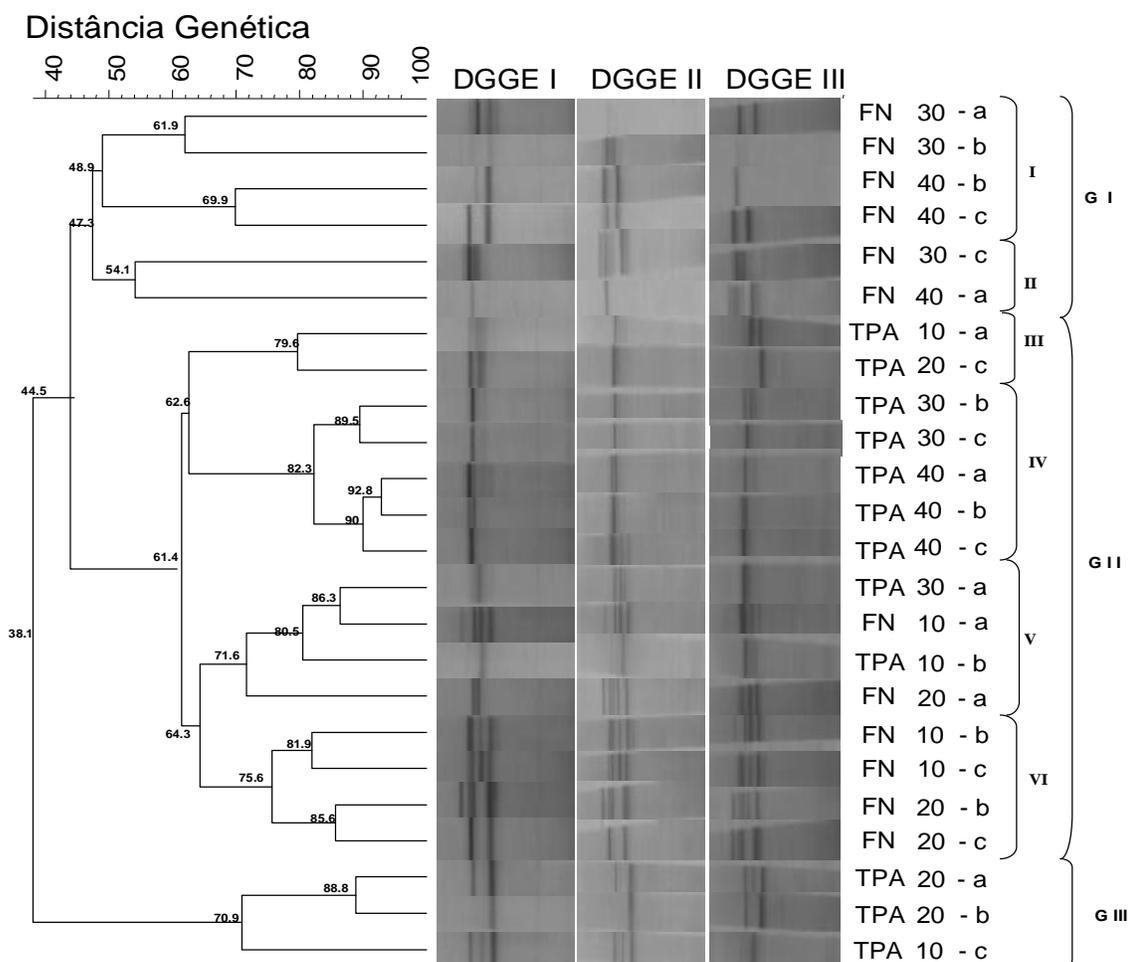


Figura 14 - Dendrograma obtido pela análise por DGGE das comunidades de bactérias do gênero *Burkholderia* em área de TPA e solo de Floresta Nativa Natural, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

Na análise de agrupamento hierárquico a partir do gel de DGGE em função da presença ou ausência de bandas gerou o dendrograma obtido representando as espécies de *Burkholdeira* foi separado em três grandes grupos, GI, GII e GIII. Esta abordagem não produziu agrupamentos com amostras idênticas, sendo que o grupo mais relacionado apresentou-se com 92,8% de similaridade, e as amostras representativas de isolados de TPA agruparam-se nos GII e III. Em relação aos isolados de floresta nativa, foi possível observar a distribuição das amostras entre os grupos I e II.

O primeiro foi dividido em 2 subgrupos (I e II), agrupando apenas amostras de floresta nativa nas profundidades de 30 e 40cm com similaridade acima de 47,3% entre si.

Diferentemente do grupo I, o subgrupo III do grupo II reuniu amostras exclusivamente de área de TPA com similaridade acima de 79,6%. Ainda no grupo II foi possível verificar o agrupamento da amostra TPA 30 (b, c) do subgrupo IV com similaridade de acima de 82,3% e as amostras TPA 40 (a, b, c) mostraram-se agrupadas com similaridade acima de 90,0%. Os subgrupos V e VI reuniram amostras de TPA e FN, sendo este último na sua totalidade composto por isolados de floresta, nas profundidades de 10 e 20cm, apresentando similaridade acima de 64,3% entre os subgrupos. O grupo III apresentou-se mais isolado em relação aos demais, e agrupou amostras exclusivamente de TPA na profundidade de 20cm, com 88,8% de similaridade entre si, e 70,9% com amostras na profundidade de 10cm.

É importante notar que os grupos apresentados no dendrograma estão relacionados com pontos de isolamento (TPA e FN) e profundidades (10, 20, 30, 40cm) confirmando que as condições físicas e químicas dos ambientes afetam diretamente as comunidades microbianas presentes. Fatores como pH, quantidade de matéria orgânica, temperatura e a concentração de nutrientes influenciam a atividade das populações de microrganismos (tabela 1). Nesse sentido, o conhecimento da diversidade microbiana de ecossistemas deve iniciar-se pelo estudo das suas características físico-químicas e biológicas, assim como de suas interações com os componentes antropogênicos, como no caso da TPA.

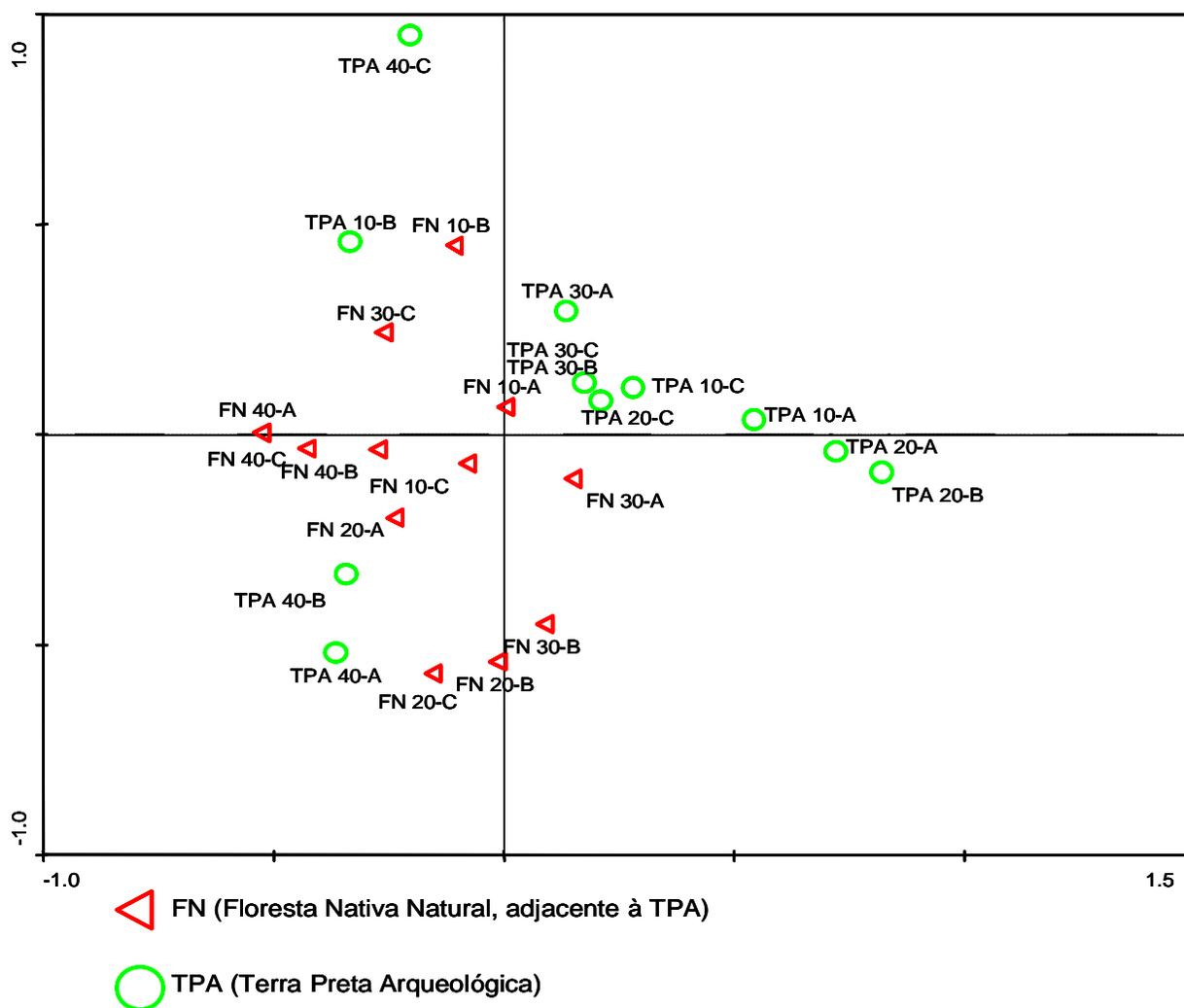


Figura 15 - Análise de PCA com bandas encontradas no DGGE utilizando os índice de similiaridade de Jaccard (J).

Na análise de componentes principais (PCA), foi possível verificar o agrupamento das amostras de Terra Preta Arqueológica (TPA) nas primeiras profundidades (10, 20, 30cm). Confirmando que a partir da profundidade 40cm a comunidade bacteriana é correspondente ao solo de floresta nativa natural.

5.2.1 Sequenciamento dos fragmentos das bandas do gel de Poliacrilamida com Gradiente

Desnaturante

O sequenciamento das UTOs excisadas do gel de DGGE proporcionou a confirmação e identificação de algumas espécies presentes nesses ambientes. Esse tipo de análise possibilita a expansão, cada vez maior, do conhecimento da filogenia e da evolução microbiana, o estudo da região que codifica o gene 16S rRNA e considerada altamente conservada entre bactérias mas, ao mesmo tempo, suficientemente variável e com quantidade de informações que são capazes de revelar, claramente, as relações filogenéticas entre as espécies (WOESE, 1987; WEISBURG et al., 1991; YOUNG et al., 1991; WILLEMS e COLLINS, 1993).

Com base nos resultados do sequenciamento, foi realizada análise comparativa das seqüências com o banco de dados internacionais *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Utilizando a ferramenta BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) visando a identificação dos microrganismos. Na análise das seqüências ocorreu baixa identidade de alguns poucos isolados em relação aos dados do NCBI (abaixo de 98%), o que pode ser um indicativo de ocorrência de novas espécies de microrganismos ou variantes, já que a taxonomia do gênero vem sendo modificada, de tal forma que novos componentes estão sendo frequentemente propostos.

Foram selecionadas para o sequenciamento todas as bandas visualizadas no gel, sendo 18 bandas para sítio de TPA e 34 para solo de floresta nativa (FN), totalizando 52 sequenciamentos. Cada amostra foi identificada como TPA ou FN nas profundidades de 10, 20, 30, 40 cm, com três repetições denominadas a, b, c.

Tabela 4 - Sequenciamento de bandas retiradas do gel de DGGE, amostras de Terra Preta Arqueológica tipo sambaqui (TPA) e solo de Floresta nativa Natural (FN) nas profundidades de 10, 20, 30 e 40 cm.

Amostra	Organismo/Ref. Banda	Ambiente e Autor	n° Acesso	pb	%	e-value
TPA 10 a	1- <i>Burkholderia</i> sp. CAC1	Rizosfera de arroz, Japão. Erry, P.T. et al., 2005.	EF143261	1032	98%	0.0
	2- <i>Burkholderia glathei</i> isolate	Áreas Contaminadas (NY). Wilson, M.S. et al., 2003.	AY154379	1034	92%	0.0
TPA 10 b	1-Não cultivado	Solo de agricultura e floresta. Upchurch, R. (NCBI).	DQ490307	394	98%	0.0
TPA 10 c	1-Não cultivado	Áreas Contaminadas (NY). Wilson, M.S. et al., 2003.	AY154379	500	96%	0.0
	2-Não cultivado	Lagoa, Ishikawa, Japão. Sakurai, K. et al., 2006.	AB252912	1031	98%	0.0
FN 10 a	1- <i>Burkholderia glumae</i>	Arroz, Panamá. Nandakumar, R. (NCBI).	EF193641	356	95%	3e-157
	2- <i>Burkholderia</i> sp. Br3469	Mimosa, América do Sul. Chen, W. M., et al., 2005.	AY773197	1103	97%	0.0
	3-Não cultivado	Agricultura e floresta. Upchurch, R. (NCBI).	DQ129011	948	98%	0.0
	4- <i>Burkholderia cepacia</i> isolate	Amostra de Água, Espanha. Chicote, E. et al., 2005.	AY509957	1415	99%	0.0
FN 10 b	1- <i>Burkholderia</i> sp. NGR195A	Isolado mimosa sp. Elliott, G.N. (NCBI).	DQ665824	978	96%	0.0
	2- <i>Burkholderia</i> sp. Br3469	Mimosa, América do Sul. Chen, W. M., et al., 2005.	AY773197	1103	97%	0.0
	3-Não cultivado	Mimosa, América do Sul. Chen, W. M., et al., 2005.	EF074448	1038	98%	0.0
	4- <i>Burkholderia cepacia</i>	Áreas agricultáveis. Kobashi, Y. et al., 2006.	AB272341	1258	99%	0.0
FN 10 c	1-Não cultivado	Solo de agricultura e floresta. Upchurch, R. (NCBI).	DQ129011	381	95%	0.0
	2-Não cultivado	Solo de agricultura e floresta. Upchurch, R. (NCBI).	DQ129011	392	95%	0.0
	3- <i>Burkholderia</i> sp. Br3469	Mimosa, América do Sul. Chen, W. M. et al., 2005.	AY773197	508	96%	0.0
	4- <i>Burkholderia glumae</i>	Arroz, Panamá. Nandakumar, R. (NCBI).	EF193641	353	95%	3e-157
TPA 20 a	1- <i>Burkholderia caribensis</i> strain	Cana de açúcar, Brasil. Reis, V.M. et al., 2005.	AY586519	452	99%	0.0
	2-Não cultivado	Solo. Jangid, K. (NCBI).	EF664234	949	97%	0.0
	3- <i>Burkholderia cepacia</i>	Experimento clínico. Lilburn, T.G. (NCBI).	AY741337	1484	99%	0.0

continua

continuação

Amostra	Organismo/Ref. Banda	Ambiente e Autor	n° Acesso	pb		
				96%	e-value	
TPA 20 b	1-Burkholderia sp	Solo. Jangid, K. (NCBI).	EF664234	1002	97%	0.0
TPA 20 c	1-Burkholderia sp. Br3446	Mimosa, América do Sul. Chen, W. M., et al., 2005.	AY77319	993	99%	0.0
	2-Burkholderia caribensis	Cana de açúcar, Brasil. Sarró, M. I. et al., 2005.	AY586519	988	99%	0.0
FN 20 a	1-Burkholderia sp. CAC1	Coleção, China. Wu, Y. (NCBI).	EF143261	952	93%	0.0
	2-Burkholderia sp. TJ182	Rizosfera. Bazhanov, D.P. et al., 2000.	AY586519	1548	100%	0.0
	1-Burkholderia cepacia	Isolado Clínico. Lilburn, T.G. (NCBI).	AY741358	1486	97%	0.0
FN 20 b	2-Burkholderia sp. 418 16S	Rizosfera. Bazhanov, D.P. et al., 2000.	AY520839	1472	98%	0.0
	3-Burkholderia sp. Ellin155	Solo pastagem, Austrália. Schoenborn, L., 2004.	AF408997	1460	97%	0.0
	4-Burkholderia sp. STM1424	Nódulos Madagascar. Rasolomam, R. et al., 2005.	AM086012	1026	98%	0.0
FN 20 c	1-Burkholderia sp. Br3469	Mimosa, América do Sul. Chen, W. M. et al., 2005.	AY773197	934	99%	0.0
	2-Não cultivado	Biorredutores. Leigh, M.B. (NCBI).	EF693724	682	94%	0.0
TPA 30 a	1-Burkholderia sp. Br3469	Mimosa, América do Sul. Chen, W. M. et al., 2005.	AY773197	1038	99%	0.0
TPA 30 b	2-Não cultivado	Rizosfera. Sanguin, H. et al., 2006.	AM157308	1464	95%	0.0
TPA 30 c	1-Não cultivado	Rizosfera. Sanguin, H. et al., 2006.	AM157308	442	99%	0.0
FN 30 a	1-Burkholderia caribensis	Cana de açúcar, Brasil. Sarró, M. I. et al., 2005.	AY586519	988	100%	0.0
	2-Não cultivado	Arroz, USA. Upchurch, R.A. (NCBI).	DQ830719	879	97%	0.0
	3-Burkholderia cepacia	Solo experimental. Kobashi, Y. et al., 2007.	AB272341	1258	98%	0.0
FN 30 b	1-Burkholderia sp.	Simbionte leguminosa. Chen, W. M. et al., 2003.	AJ505301	1388	99%	0.0
	1-Burkholderia cepacia	Solo agricultura. Kobashi, Y. et al., 2007.	AB272341	1363	99%	0.0
FN 30 c	2-Burkholderia sp. mpa3.10	Mimosa, Austrália. Parker, M.A. (NCBI).	DQ156084	945	95%	0.0
	3-Burkholderia sp. Br3469	Mimosa, América do Sul. Chen, W. M. et al., 2005.	AY773197	440	98%	0.0
	4-Não cultivado	Agricultura e floresta. Upchurch, R. (NCBI).	DQ129011	1054	98%	0.0

continua

continuação

<i>Amostra</i>	<i>Organismo/Ref. Banda</i>	<i>Ambiente e Autor</i>	<i>n° Acesso</i>	<i>pb</i>	<i>%</i>	<i>e-value</i>
TPA 40 a	1-Não cultivado	Rizosfera. Sanguin,H. et al., 2006.	AM157308	442	95%	0.0
TPA 40 b	1- <i>Burkholderia</i> sp.	Solo agricultura, Michigan. Jangid,K. (NCBI).	EF665799	442	94%	0.0
	2- <i>Burkholderiaceae bacterium</i>	Rizosfera. Sanguin,H. et al., 2006.	AM157308	442	99%	0.0
FN 40 a	1-Não cultivado	Pastagens, USA. Jangid,K. (Unpublished).	EF073773	1449	96%	0.0
FN 40 b	1- <i>Burkholderia caribensis</i>	Cana de açúcar, Brasil. Reis,V.M. (NCBI).	AY586519	1034	99%	0.0
	2- <i>Burkholderia</i> sp. <i>ESR108</i>	Cana de açúcar, Brasil. Mendes,R. (NCBI).	EF602567	1411	99%	0.0
FN 40 c	1- <i>Burkholderia</i> sp. <i>Br3469</i>	Mimosa, América do Sul. Chen, W. M. et al., 2005.	AY773197	930	99%	0.0
	2- <i>Burkholderia cepacia</i>	Experimento clínico. Lilburn,T.G. (NCBI).	AM711586	491	98%	0.0

5.2.2 Análise das sequências de UTOs obtidas pela técnica de DGGE

As sequências dos perfis de bandas obtidos no gel de poliacrilamida foram analisados através do programa “BioNumerics” (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica) para a construção de relações filogenéticas (dendrogramas) para cada região gênica, pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with arithmetic means, Sneath & Sokal, 1973) e coeficiente de Jaccard. A partir da análise dos UTOs excisados dos géis obtidos por meio da técnica de DGGE, foi possível observar, de um modo geral, que as amostras de floresta nativa reuniram a maior variedade de espécies do gênero *Burkholderia*.

O agrupamento hierárquico gerado a partir do sequenciamento das bandas com amostras de Terra Preta Arqueológica nas profundidades de 10, 20, 30 e 40 cm gerou um dendrograma (figura 17) representado por dois grupos, sendo que o primeiro reuniu apenas 3 estirpes com similaridade acima de 60,0% entre si. O grupo II reuniu um número maior de indivíduos, com similaridade em torno de 79,0%, e agrupou os isolados com a maior diversidade de espécies e com importante potencial para a microbiota do solo, como as estirpes de *Burkholderia caribensis*, *Burkholdeira glathei* e *Burkholdeira cepacia*.

Burkholderia cepacia foi inicialmente identificada como patogênica, causadora do apodrecimento da casca de cebola (BURKHOLDER, 1950), mas atualmente é também caracterizada em uma ampla escala de funções como, por exemplo, a fixação biológica do nitrogênio e como patógeno causador da fibrose cística humana (BEVIVINO et al, 1994). Apesar desta espécie não ser comumente encontrada em solos, em detrimento das outras espécies do gênero, um isolado de Terra Preta apresentou 99% de similaridade com a espécie *cepacia* (TPA 20 a3), podendo indicar que houve introdução da espécie nos solos de Terra Preta por meio da interferência antropogênica característica deste ambiente. Diferentemente, na amostragem da floresta nativa foram encontradas cinco estirpes de *Burkholderia cepacia*, conseqüentemente em função da alta diversidade microbiana e do papel desta espécie na fixação biológica do nitrogênio pela vegetação dos solos adjacentes.

Ainda neste dendrograma é importante notar que os padrões (EMBRAPA-CNPAB) apresentaram-se como um grupo externo distantemente relacionado aos demais isolados. Do ponto de vista da diversidade de populações microbianas em solos de TPA, este resultado torna-se bastante interessante, uma vez que pode demonstrar a extensa variabilidade genética e estrutura características de microrganismos presentes neste solo, em comparação com as seqüências já depositadas em bancos de dados disponíveis.

As amostras de Floresta Nativa (FN) revelaram um maior número de microrganismos quando comparado aos resultados obtidos com amostras de TPA. O dendrograma gerou dois grupos (I e II), com similaridade de 34,8% entre si. Em contraste com a análise anterior, neste agrupamento as estirpes utilizadas como padrões reuniram-se as demais (grupo II), não ocorrendo a formação de um grupo externo, e agrupando isolados de *B. glumae*, não tendo sido observada a presença desta espécie nas amostras de TPA.

A grande maioria das estirpes reuniu-se no grupo I, relacionando todos os isolados da espécie *cepacia*, com 100% de identidade, e *caribensis*, juntamente com 1 estirpe de *B. terricola* (FN 10b1), descrita na literatura como isolado de *Mimosa sp.* (GORIS, J. et al., 2002).

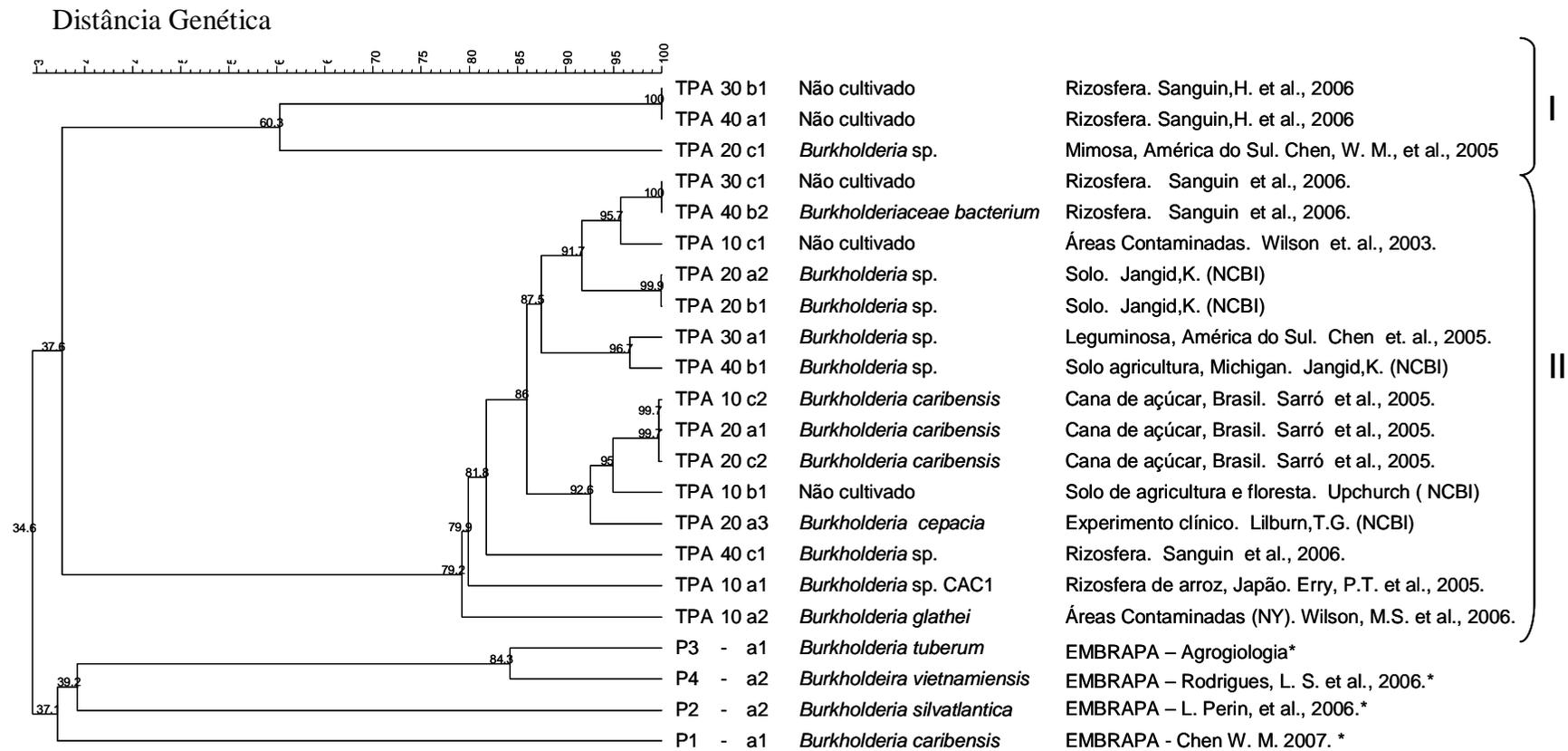


Figura 16 - Dendrograma obtido a partir do sequenciamento de UTOs excisadas do gel de DGGE, amostras de Terra Preta Arqueológica (TPA), com algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J). (*Estirpes padrões., fonte: EMBRAPA/CNPAB-RJ). As repetições foram representadas pelas letras a, b, c.

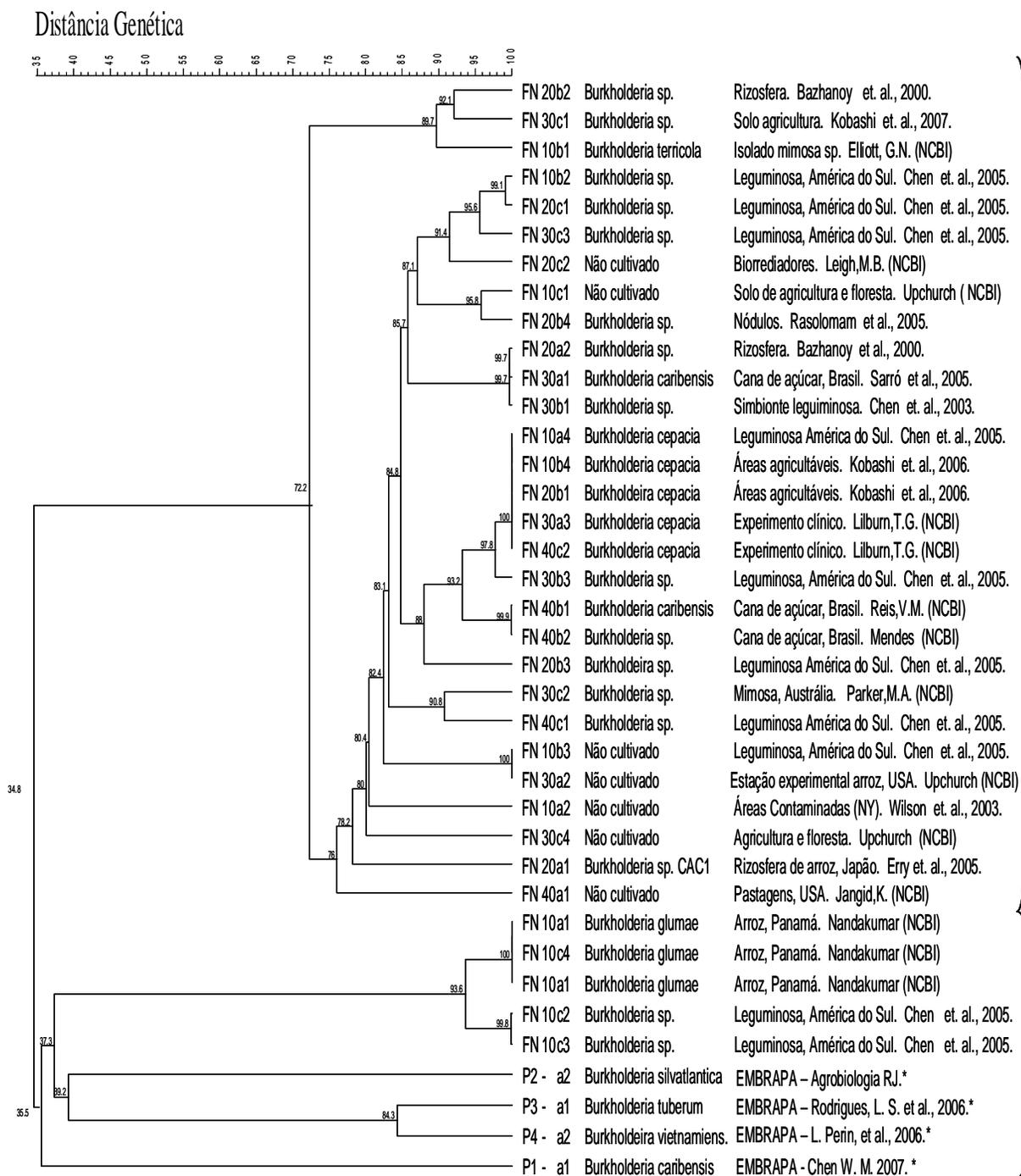


Figura 17 - Dendrograma obtido a partir do sequenciamento das bandas recortadas do gel de DGGE, amostras de Terra Preta Arqueológica (TPA), com algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J). (*Estirpes padrões., fonte: EMBRAPA/CNPAB-RJ). As repetições foram representadas pelas letras a, b, c.

Um grande avanço nos estudos de ecologia microbiana foi dado com o advento de técnicas moleculares, baseadas na análise do DNA de microrganismos diretamente dos ambientes, sem a necessidade de multiplicação prévia das células (BENLLOCH et al., 1995).

O solo é um ambiente dinâmico, fatores como aspectos físicos, químicos e vegetação predominante podem determinar a estrutura e composição de espécies das comunidades bacterianas. O conhecimento da estrutura e composição de espécies que compõem comunidades bacterianas é fundamental para o entendimento de como os processos biológicos associados às plantas podem ser influenciados por meio de fatores ambientais e, por consequência, terem aplicações biotecnológicas.

Entre os fatores analisados no presente estudo, estamos relacionando as profundidades e diferenças entre áreas de “Terra Preta Arqueológica do Tipo Sambaqui” e solos de floresta nativa, adjacentes à TPA. As informações sobre a diversidade do gênero *Burkholderia* em solos da região Amazônica obtidas neste trabalho levantam um grande potencial para estudos futuros em áreas ainda pouco exploradas, visto que uma maior diversidade de espécies do gênero foi encontrada em solo de floresta nativa natural.

A técnica do DGGE permitiu a identificação de espécies nas áreas de estudo, mostrando ser útil em estudos de diversidade microbiana, especialmente quando se tem como foco espécies de um gênero bastante estudado quanto à sua identificação molecular, como no caso, das espécies já identificadas como *Burkholderia*. A técnica é classificada como muito apropriada, não somente para caracterizar comunidades complexas, mas também para inferir filogenia dos membros da comunidade, testar pureza de linhagens bacterianas, monitorar o isolamento de bactérias a partir de amostras ambientais e acompanhar a dinâmica de populações específicas em função de variações ambientais ou das condições operacionais de um sistema. É importante considerar algumas limitações quando utilizamos a técnica para estudo de ecologia microbiana. Normalmente, consideramos cada banda do gel, após o DGGE, como uma espécie microbiana. Porém, sabemos que muitas bactérias possuem mais

de uma cópia do rDNA 16S, os quais podem apresentar diferentes mobilidades no gel, resultando em múltiplas bandas da mesma espécie (BOON, 2000; NUBEL et al., 1996).

O DGGE é considerado muito adequado quando o objetivo é comparar duas ou mais amostras. Se o padrão de bandejamento apresentado for diferente, então, certamente as comunidades microbianas apresentam diferenças, caso o padrão de bandejamento seja o mesmo, então estas diferenças poder estar representadas pelas mesmas comunidades microbianas. (MUYZER et al., 1993 e JACKSON, 2000). Devido às limitações apresentadas, pode-se afirmar que o número de espécies presentes em um ambiente como o solo é muito maior do que aquele estimado por análise em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante.

Com tantas diferenças já relatadas dentro do gênero, com o constante avanço das técnicas de biologia molecular, será possível, em breve, identificar novas mudanças. É fundamental, portanto, estar atualizado com as novas correntes taxonômicas e atentar para o fato de que, certamente, a cada ano, novos gêneros e espécies são descritos ou reclassificados, seguindo uma tendência lógica.

Apesar da maior estabilidade e presença de matéria orgânica em áreas com sítio arqueológico de Terra Preta, o comportamento das populações observados neste trabalho foi distinto entre as áreas. O gênero *Burkholderia* possui como característica a capacidade de utilizar diversas fontes de carbono para seu crescimento, crescer em pH próximo de característica encontrada nas amostras de floresta nativa. O levantamento de bactérias do gênero *Burkholderia* realizado no presente estudo revela um padrão de bandas diferenciado entre as amostras, vindo a confirmar que aspectos físico-químicos e a vegetação predominante nas áreas de estudo afetam diretamente na composição das comunidades microbianas. Estes dados refletem a complexidade dos sistemas naturais e a dificuldade do estabelecimento de padrões de qualidade para que comparações sejam realizadas.

Estudos já identificaram espécies de *Burkholderia* como agentes de biocontrole, fixadores biológicos do nitrogênio (FBN), biorremediadores, com amplo potencial na

produção de plásticos biodegradáveis, patógenos em humanos, entre outras características que tornam estudos detalhados desse gênero essencial na descoberta de novas estratégias para uso biotecnológico, agrícola, médico, entre outros.

6. CONCLUSÕES

As populações de bactérias pertencentes à ordem *Burkholderiales* são numericamente superiores em solo de floresta nativa natural, quando comparadas as encontradas em sítios de Terra Preta Arqueológica do tipo sambaqui, na mesma região. Aspecto como pH do solo, caracterizado como baixo pode ser um determinante pela maior frequência desse gênero adaptado à acidez. Usando de técnica de DGGE foi comprovado nesse estudo que as bactérias *Burkholderia* são encontradas principalmente nas primeiras camadas (10 e 20 cm), em ambos os solos, diminuindo gradativamente com o aumento da profundidade.

Pelo cultivo seletivo e análise das seqüências geradas pela amplificação do gene 16S rRNA, observou-se a baixa identidade de alguns isolados em relação ao banco de dados do NCBI (abaixo de 98%), o que pode ser um indicativo de ocorrência de novas variantes de microrganismos, esse resultado contribui para um melhor conhecimento da taxonomia desse gênero presente em solos de floresta tropical úmida da Amazônia, ainda pouco explorada quanto à sua ecologia microbiana já que a taxonomia do gênero vêm sendo modificada, de tal forma que novos componentes estão sendo frequentemente propostos.

REFERÊNCIAS

- ADJEI, M. D.; OHTA, Y. Isolation and characterization of a cyanide-utilizing *Burkholderia cepacia* strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 15, p. 699-704, 1999.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHNEIDER, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 59, p. 143-169, 1995.
- BALDANI, J. I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* nov. sp. a root associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** 1996. 234 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1996.
- BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 72, p. 1198-1206, 2006.
- BURBAGE, D. A.; SASSER, M. A medium selective for *Pseudomonas cepacia*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 76, p. 706, 1982.
- BAZHANOV, D. P. et al. Mutants of nitrogen-fixing rhizospheric bacterium *Pseudomonas* sp. 418 with loss of the ability to colonize roots. **Russian Journal of Genetics**, Moscow, v. 32, p. 106-110, 2000.
- BURKHOLDER, W. H. Sour Skin, a bacteria rot of onion bulbs. **Phytopathology**, Lancaster, v. 40, p. 115-117, 1950.

CABALLERO-MELLADO, J. et al. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1165-1172, 2004.

CAIN, C. C. et al. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 4139-4141, 2000.

CARTWRIGHT, D. K.; CHILTON, W. S.; BENSON, D. M. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5Æ5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 43, p. 211–216, 1995.

CHEN, W. M. et al. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel Mimosa-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 7461-71, 2005.

CHEN, W. M. et al. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel Mimosa-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 7461-7471, 2005.

CHICOTE, E. et al. Isolation and identification of bacteria from spent nuclear fuel pools. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 32, p. 155-162, 2005.

COENYE, T. et al. *Burkholderia cocovenenans* (van Damme et al., 1960) Gillis et al., 1995 and *Burkholderia vandii* Urakami et al., 1994 are junior synonyms of *Burkholderia gladioli* (Severini, 1913) Yabuuchi et al., 1993 and *Burkholderia plantarii* (Azegami et al., 1987) Urakami et al., 1994 respectively. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 49, p. 37-42, 1999.

COENYE, T. et al. Use of PCR analyses to define the distribution of *Ralstonia* species recovered from patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, p. 3463-3466, 2005.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 719-729, 2003.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 228, p. 45-49, 2003.

DENEVAN, W. The aboriginal population of Amazonia. In: DENEVAN, W. (Ed.). **The native population of the Americas in 1492**. Madison: University of Wisconsin Press, 1976. p. 205-234.

DUA, M. et al. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 59, p. 143-152, 2002.

EL BANNA, N.; WINKELMANN, G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, p. 69-78, 1998.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

GILLIES, M. et al. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. Nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, p. 272-286, 1995.

GLASER, B. et al. Persistence of soil organic matter in Archaeological soils (Terra Preta) of the Brazilian Amazon region. In: REES, R. M. et al. (Ed.). **Sustainable management of soil organic matter**. Wallingford: CABI Publishing, 2001. p. 190-194.

GORIS, J. et al. Diversity of transconjugants that acquired plasmid pJP4 or pEMT1 after inoculation of a donor strain in the A- and B-horizon of an agricultural soil and description of

Burkholderia hospita sp. nov. and *Burkholderia terricola* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 25, n. 3, p. 340-352, 2002.

HAGEDORN, C. et al. A selective medium for enumeration and recovery of *Pseudomonas cepacia* biotypes from soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 53, p. 2265–2268, 1987.

HASEGAWA, T.; HONMA, S.; OSAKI, M. Phosphorus solubilizing microorganisms in the rhizosphere of local rice varieties grown without fertilizer on acid sulfate soils. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 61, p. 679-681, 2005.

HEBBAR, K. P.; MARTEL, M. H.; HEULIN, T. Suppression of pre- and post-emergence damping-off in corn by *Burkholderia cepacia*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 29-36, 1998.

HEUER, H. et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HEYDARI, A.; MISAGHI, I. J. Biocontrol activity of *Burkholderia cepacia* against *Rhizoctonia solani* in herbicide-treated soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 202, p. 109-116, 1998.

HILL, G. T. et al. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 25-36, 2000.

LAMBAIS, M. R. et al. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science**, Washington, v. 312, p. 1917, 2006.

Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. New York, NY, John Wiley and Sons: p.115-175, 1991.

LEHMANN, J. et al. (Ed.). **Amazonian dark earths: Origin, properties & management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. 505 p.

LI, W. et al. Broad spectrum antibiotic activity and disease suppression by the potential biocontrol agent *Burkholderia ambifaria* BC-F. **Crop Protection**, Guildford, v. 21, p. 129-135, 2002.

MALTSEVA, O. V. et al. Degradation of anaerobic reductive dechlorination products of Aroclor 1242 by four aerobic bacteria. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 10, p. 363-371, 1999.

MARK, S. et al. Horizontal transfer of *phnAc* dioxygenase genes within one of two phenotypically and genotypically distinctive naphthalene-degrading guilds from adjacent soil environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 2172–2181, 2003.

MULLIS, K. B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annales de Biologie Clinique**, Paris, v. 48, n. 8, p. 579-582, 1990.

MUYZER, G.; SAMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 73, p. 27-141, 1998.

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

PALLERONI, N. J. Prokaryotic diversity and the importance of culturing. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 72, p. 3-19, 1997.

PANDEY, P.; KANG, S. C.; MAHESHWARI, D. K. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. **Current Science**, Bangalore, v. 89, n. 1, p. 177-180, 2005.

PARKER, M.; WURTZ, A.; PAYNTER, Q. Nodule symbiosis of invasive *mimosa pigra* in australia and in ancestral habitats: a comparative analysis. [Biological Invasions](#), Berlin, v. 9, p. 127-138, 2007.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 167-177, 2000.

RASOLOMAMPIANINA, R. et al. Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to alpha- and beta-Proteobacteria. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 4135-4146, 2005.

REIS, V. M. et al. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

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

SAKURAI, K.; TAZAKI, K.; YAMAGUCHI, K. Identification of bacteria in an iron-oxidation biofilm at Shibayama lagoon, Ishikawa, Japan. **DDBJ/EMBL/GenBank Databases**, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 20 jun. 2007.

SARRÓ, M. I.; GARCÍA, A. M.; MORENO, D. A. Biofilm formation in spent nuclear fuel pools and bioremediation of radioactive water. **International Microbiology**, Madrid, v. 8, p. 223-230, 2005.

SCHOENBORN, L. Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 4363-4366, 2004.

SMITH, N. J. H. Anthrosols and human carrying capacity in Amazonia. **Annals of the Association of American Geographers**, Washington, v.70, p.553-566, 1980.

TIEDJE, J. M. et al. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, p. 109-122, 1999.

TRÂN VAN, V. et al. Isolation and nitrogenase activity of *Burkholderia vietnamiensis*, a nitrogen-fixing bacterium associated with rice (*Oryza sativa* L.) on a sulphate acid soil of Vietnam. **Agronomie**, Paris, v. 16, p. 479-491, 1996.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 56, p. 782-787, 1990.

TSAI, S. M. et al. Diversidade bacteriana em terra preta de índio baseada em seqüenciamento do gene 16S rRNA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: SBCS. 2003. 1 CD-ROM.

VANDAMME, P. et al. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 1188-1200, 1997.

WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Diazotrophic bacteria in banana plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 2277-2285, 2000.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WHITMAN, W. B. et al. Molecular analyses of prokaryotic communities from agricultural and forest soils. In: DAVEFEST, 2005, Athens. **Posters...** Athens: University of Georgia, Institute of Ecology, 2005.

WILSON, M. S. et al. Horizontal transfer of phnac dioxygenase genes within one of two phenotypically and genotypically distinctive naphthalene-degrading guilds from adjacent soil environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 2172-2181, 2003.

YABUUCHI, E. et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 36, p. 1251-1275, 1992.

YANG, H. et al. *Burkholdeira terrae* sp. nov., isolated from a forest soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Korea, v. 56. p. 453-457, 2006.